



**Universidad Nacional de La Plata**  
Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis para optar por el grado de  
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

# Estudio de la Fisiopatología del Sistema Inmune en la Enfermedad de Fabry

Bioq. Pablo Nicolás De Francesco

Dirección: Dra. Paula Adriana Rozenfeld

Codirección: Dr. Carlos Alberto Fossati

Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune – LISIN

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

**2013**



LABORATORIO DE INVESTIGACIONES DEL SISTEMA INMUNE  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



Me lo contaron y lo olvidé.  
Lo vi y lo entendí.  
Lo hice y lo aprendí.

—Proverbio chino,  
atribuido a Confucio



## Índice

<b>Índice .....</b>	<b>5</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>9</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>11</b>
<b>Prefacio.....</b>	<b>13</b>
<b>Introducción general.....</b>	<b>17</b>
Las Enfermedades Lisosomales .....	17
La Enfermedad de Fabry .....	22
<b>Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>29</b>
Pacientes .....	29
Técnicas generales .....	30
Extracción y procesamiento inicial de las muestras de pacientes .....	30
Cultivo celular.....	30
Medidas de Expresión Génica .....	30
Citometría de Flujo.....	33

Métodos inmunoquímicos .....	33
Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	34
Estadística.....	34
Técnicas específicas.....	35
Análisis de subpoblaciones de leucocitos y expresión de marcadores de superficie .....	35
Apoptosis en PBMC en la Enfermedad de Fabry.....	35
Perfil proinflamatorio en la Enfermedad de Fabry .....	38
<b>Caracterización de leucocitos en la Enfermedad de Fabry .....</b>	<b>41</b>
Introducción .....	41
Análisis de subpoblaciones de leucocitos y expresión de marcadores de superficie en la Enfermedad de Fabry .....	45
Análisis de subpoblaciones leucocitarias .....	45
Expresión de Gb <sub>3</sub> y marcadores de superficie.....	48
Expresión génica de marcadores de superficie en PBMC de pacientes con Enfermedad de Fabry.....	51
Características ultraestructurales de las PBMC en la Enfermedad de Fabry mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).....	52
<b>Apoptosis en PMBC en la Enfermedad de Fabry.....</b>	<b>57</b>
Introducción .....	57
Marcadores de apoptosis en PBMC en la Enfermedad de Fabry.....	61
Vías apoptóticas activas en PBMC en la Enfermedad de Fabry .....	61
Tratamiento in vitro de PBMC con Gb3 .....	64
Marcadores de estrés de retículo endoplásmico en PBMC en la Enfermedad de Fabry.....	68
Marcadores de estrés oxidativo en PBMC en la Enfermedad de Fabry.....	69
<b>Perfil proinflamatorio en la Enfermedad de Fabry .....</b>	<b>71</b>
Introducción .....	71

Expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias en PBMC de Pacientes con Enfermedad de Fabry.....	73
Producción aumentada de citoquinas proinflamatorias en subpoblaciones de la inmunidad innata en sangre periférica .....	76
Efecto del tratamiento <i>in vitro</i> con Gb <sub>3</sub> y DGJ sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en células THP-1 .....	80
Efecto del tratamiento <i>in vitro</i> con Gb <sub>3</sub> y DGJ sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en cultivos de células dendríticas y monocitos derivados a partir de PBMC normales.....	81
<b>Discusión y Conclusiones .....</b>	<b>87</b>
Discusión .....	87
Conclusiones .....	97
<b>Referencias .....</b>	<b>99</b>





## Agradecimientos

Deseo agradecer a mi directora, Dra. Paula Rozenfeld, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella y realizar esta Tesis, y haber puesto todo su conocimiento y experiencia en la tarea de guiarme en mi labor. Su aplicación, paciencia y respeto hicieron de este aprendizaje compartido una tarea mucho más grata.

A mi co-director y director del LISIN, Dr. Alberto Fossati, por haberme recibido de manera cordial y sincera en el laboratorio, y haber sabido brindarme su valiosa guía y oportunos consejos.

A los Dres. Fernando Chirido, Martín Rumbo, Guillermo Docena, y Gustavo Rinaldi por su ayuda desinteresada, sus charlas amenas, y sus sugerencias invaluable.

A Belén, mi compañera. Su apoyo incondicional, su cariño y buen humor hicieron una diferencia inmensa en esta etapa de mi vida.

A mi familia y amigos, por haber alentado y apoyado siempre mis proyectos.

A todos mis compañeros del LISIN, los que están ahora y los que estuvieron ayer, con los que tuve la fortuna de compartir el día a día. La camaradería, calidez y franca amistad que me brindaron durante todo este tiempo, reflejos de una calidad humana excepcional, son algo que voy a atesorar siempre.

Quiero agradecer especialmente a Romi, Juan y Flor, mis compañeros de grupo, por su ayuda constante y apoyo invaluable. Trabajar en su compañía ha sido un verdadero placer.

Vaya aquí también mi agradecimiento individual a Paolín, Loli, Facu, Mingo, Costy, Saraya, Gri, Yani y David, por sus contribuciones particulares a mi trabajo y mi formación.

Deseo, además, expresar mi gratitud al CONICET, sin cuyo apoyo económico no podría haber realizado mi trabajo, y a la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por haberme brindado un espacio de excelencia para desarrollar mi formación académica, tanto de grado como de posgrado.

Finalmente, mi reconocimiento a Luis Federico Leloir, que durante las noches de redacción me ayudó con su sabiduría natural a interrumpir oportunamente mis horas de escritura y extender mis horas de sueño.

## Abreviaturas

**Nota:** En el presente trabajo se decidió adoptar algunas de las abreviaturas inglesas normalmente utilizadas en la literatura específica del tema en ese idioma, ya sea porque su uso está ampliamente difundido en nuestro medio, o por no existir equivalentes de uso establecido en español. En estos casos, se aclara la forma inglesa entre paréntesis junto a su traducción castellana.

αGal:	α-galactosidasa A
AIF:	Factor inductor de apoptosis ( <i>Apoptosis-inducing factor</i> )
BSA:	Seroalbúmina bovina ( <i>Bovine serum albumin</i> )
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario ( <i>complementary DNA</i> )
CLEAR:	[Red de] Expresión y regulación coordinada lisosomal ( <i>coordinated lysosomal expression and regulation [network]</i> )
CPA:	Célula presentadora de antígeno
Ct:	Número de ciclo en la intersección con el umbral [en qPCR] ([qPCR] <i>Cycle threshold</i> )
DC	Célula dendrítica ( <i>Dendritic Cell</i> )
DGJ:	Deoxigalactonojirimicina
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DTT:	Ditiotreitol
ΔΨ <sub>m</sub> :	Potencial de membrana mitocondrial
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EF:	Enfermedad de Fabry
EL:	Enfermedad(es) Lisosomal(es)
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
ERT:	Terapia de reemplazo enzimático ( <i>Enzyme Replacement Therapy</i> )
FACS:	Citometría de flujo ( <i>Fluorescence Assisted Cell Sorting</i> )

FSC:	Dispersión frontal ( <i>Forward Scatter</i> )
Gb <sub>3</sub> :	Globotriaosilceramida
GDI:	Gen de interés
GlCer:	Glucosilceramida
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ( <i>Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor</i> )
HDL:	Lipoproteína de alta densidad ( <i>High Density Lipoprotein</i> )
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacetansulfónico
iNKT:	[Célula] T NK invariante ( <i>Invariant NK T [cell]</i> )
JC-1:	Ioduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina
LDL:	Lipoproteína de baja densidad ( <i>Low Density Lipoprotein</i> )
LPS:	Lipopolisacárido
MC:	Monocito o célula monocítica ( <i>Monocytic cell</i> )
M-CSF:	Factor estimulante de colonias de macrófagos ( <i>Macrophage Colony-Stimulating factor</i> )
MET:	Microscopía electrónica de transmisión
MΦ:	Macrófago
MFI:	Intensidad de fluorescencia media ( <i>Mean Fluorescence Intensity</i> )
MPS:	Mucopolisacaridosis
NK:	[Célula] "Asesina natural" ( <i>Natural Killer [cell]</i> )
NLR:	Receptor tipo <i>Nod</i> ( <i>Nod-like receptor</i> )
PAMP:	Patrón molecular asociado a patógeno ( <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i> )
PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS:	Solución tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Saline Buffer</i> )
pb:	Pares de bases
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo ( <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
PRR:	Receptor de reconocimiento de patrones ( <i>Pattern recognition receptor</i> )
RE:	Retículo endoplásmico
rh-:	Recombinante humano
RT:	Retrotranscripción, o transcripción reversa
ROS:	Especies reactivas del oxígeno ( <i>Reactive oxygen species</i> )
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS) ( <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SEAL:	Sistema endocítico-autofágico-lisosomal
SEM:	Error estándar de la media ( <i>Standard Error of the Mean</i> )
SF:	Solución fisiológica
SFB:	Suero fetal bovino
SOD:	Superóxido dismutasa
SSC:	Dispersión frontal ( <i>Side scatter</i> )
TBS:	Solución tampón Tris [tris(hidroximetil)aminometano] salino ( <i>Tris-buffered saline</i> )
TFEB:	Factor de transcripción EB ( <i>transcription factor EB</i> )
TLR:	Receptor tipo <i>toll</i> ( <i>Toll-like receptor</i> )
UPR:	Respuesta a proteínas desplegadas ( <i>Unfolded protein response</i> )

## Prefacio

Una parte de los resultados que conforman la presente Tesis fue publicada oportunamente en los artículos:

- **“Leukocyte perturbation associated with Fabry disease.”** Rozenfeld P, Agriello E, De Francesco N, Martinez P, Fossati C. *J Inherit Metab Dis.* 2009 Mar 7.
- **“Higher apoptotic state in Fabry disease peripheral blood mononuclear cells. Effect of globotriaosylceramide.”** De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA. *Mol Genet Metab.* 2011 Nov;104(3):319-24. [Epub 2011 Jun 16]
- **“Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of globotriaosylceramide.”** De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA. *Mol Genet Metab.* Manuscrito aceptado, en prensa. [12 Feb 2013]. Disponible online en <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.02.003>

Además, del presente trabajo se desprendieron resultados que fueron presentados en diferentes reuniones científicas:

- **Globotriaosylceramide (Gb<sub>3</sub>) Induces a Proinflammatory Cytokine Profile in Dendritic Cells and Macrophages. Consequences for Fabry Disease.** De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Rozenfeld PA. *Lysosomal Disease Network's WORLD Symposium 2013, 13 al 15 de febrero de 2013, Orlando, Florida, EEUU.*
- **Producción de citoquinas proinflamatorias por tratamiento con Gb<sub>3</sub> y DGJ en células dendríticas y macrófagos derivados de PBMC normales. Implicaciones para la fisiopatología de la Enfermedad de Fabry.** De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Rozenfeld PA. *LVII Reunión Científica Anual SAIC - LX Reunión Científica Anual SAI 2012, 14 al 17 de noviembre, Mar del Plata, Argentina.*
- **Evaluation of the apoptotic effect of globotriaosylceramide (Gb<sub>3</sub>) on normal mononuclear cells: implication for Fabry disease.** P. Rozenfeld, N. De Francesco, C. Fossati. *60th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 2 al 6 de noviembre de 2010, Washington, EEUU.*
- **Elevado nivel de producción de citoquinas proinflamatorias en células de respuesta innata de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Fabry.** De Francesco PN, Fossati CA, Rozenfeld PA. *LIV Reunión Científica Anual de la SAIC - LVII Reunión Anual de la SAI. 18- 21 de noviembre de 2009, Mar del Plata, Argentina.*
- **Apoptosis aumentada por tratamiento con globotriaosilceramida (Gb<sub>3</sub>) sobre células mononucleares de sangre periférica. Implicancias para la enfermedad de Fabry.** De Francesco PN, Fossati CA, Rozenfeld PA. *LIV Reunión Científica Anual de la SAIC - LVII Reunión Anual de la SAI. 18- 21 de noviembre de 2009, Mar del Plata, Argentina.*
- **Unfolded protein response (UPR) is not a mediator of apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from Fabry Disease patients.** Rozenfeld P, De Francesco N, Fossati C. *59th. Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 20 al 24 de octubre de 2009, Hawaii, E.E.U.U.*

- **A common cytokine profile in Fabry, Gaucher and Hunter diseases.** Rozenfeld P, De Francesco N, Fossati C. *58th. Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 11 al 16 de noviembre de 2008, Philadelphia, E.E.U.U.*
- **Citoquinas en células mononucleares de sangre periférica en enfermedades de acumulación lisosomal.** De Francesco PN, Fossati CA, Rozenfeld PA. *LVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 22, 23 y 24 de octubre de 2008, La Falda (Córdoba), Argentina.*
- **Proinflammatory cytokine profile from mononuclear cells of fabry disease patients.** Rozenfeld P, de Francesco N, Kisinovsky I, Fossati C. *8th. International Symposium on Lysosomal Storage Diseases. 27 y 28 de abril de 2008, Paris, Francia.*
- **Marcadores de apoptosis en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Fabry.** De Francesco PN, Procopio D, Fossati CA, Rozenfeld PA. *I Congreso Latinoamericano de Enfermedades Lisosomales. 28 de noviembre al 2 de diciembre de 2007, San Juan, Argentina.*
- **Flow cytometric study of leukocytes and cell markers from Fabry disease patients.** Rozenfeld P, Agriello E, Martinez P, de Francesco N, Kisinovsky I, Fossati CA. *I Congreso Latinoamericano de Enfermedades Lisosomales. 28 de noviembre al 2 de diciembre de 2007, San Juan, Argentina.*
- **Flow cytometric study of leukocytes and cell markers from Fabry disease patients.** Rozenfeld P, Agriello E, Martinez P, De Francesco N, Kisinovsky I, Fossati C. *57<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 21 al 26 de octubre de 2007, San Diego, E.E.U.U.*
- **Analysis of peripheral blood leukocyte subpopulations and cell markers from Fabry disease patients.** Rozenfeld P, Martinez P, Agriello E, de Francesco N, Aggio M, Kisinovsky I, Fossati C. *7th. International Symposium on Lysosomal Storage Diseases. 27 y 28 de abril de 2007, Roma, Italia.*





## Introducción general

### Las Enfermedades Lisosomales

Las enfermedades lisosomales (EL) comprenden actualmente un grupo de alrededor de 70 patologías de origen genético caracterizadas por la deficiencia de alguna de las proteínas que intervienen en la estructura y función normal de los lisosomas. La incidencia estimada de todas estas enfermedades tomadas en conjunto varía de 1/4000 a 1/9000 nacidos vivos entre diferentes reportes bibliográficos (Fuller et al., 2006). El patrón de herencia más común entre las EL es el autosómico recesivo, aunque existen tres EL cuyo patrón es ligado al X, siendo la enfermedad de Fabry una de ellas.

Las EL pueden ser clasificadas según varios criterios. Mientras que históricamente estos desórdenes fueron agrupados en base a la naturaleza de los sustratos que se acumulan (esfingolipidosis, mucopolisacaridosis, oligosacaridosis, etc.), en años recientes se ha afianzado la tendencia a clasificarlos por el defecto molecular asociado (**Tabla 1**) (Filocamo y Morrone, 2011; Platt et al., 2012).

Clásicamente, esta familia de enfermedades comprendía únicamente las deficiencias de las enzimas catabólicas lisosomales, hidrolasas ácidas encargadas de degradar moléculas complejas. Más recientemente, sin embargo, el concepto de EL se ha ampliado para incluir deficiencias en proteínas necesarias para la modificación post-traducciona

lisosomales (en su mayoría glicoproteínas), cofactores proteicos, transportadores de membrana lisosomales, o proteínas importantes para el correcto tráfico intracelular entre el lisosoma y otros compartimentos celulares (Walkley, 2009).

La ausencia o disminución de una actividad enzimática lisosomal ocasiona la acumulación de sustratos en los lisosomas. Las EL son patologías multisistémicas, crónicas y progresivas. Cada EL tiene su patrón específico de acumulación de sustancias en los lisosomas, su conjunto específico de órganos alterados y por lo tanto, de manifestaciones clínicas en los pacientes afectados. Al ser patologías progresivas, con la edad del paciente, el avance de la enfermedad conduce a alteraciones fisiopatológicas de los órganos que en muchos casos se vuelven irreversibles.

El diagnóstico de las EL comienza por la sospecha clínica, que, en el caso de no existir antecedentes familiares, suele requerir de mucha experiencia por parte del médico debido a la baja incidencia de estas enfermedades y la variabilidad que pueden presentar en la aparición de sus signos y síntomas. El protocolo a seguir varía según cada patología, pero invariablemente se apoya en la evaluación bioquímica, y suele incluir diferentes técnicas para orientar la evaluación clínica: diagnóstico por imágenes, evaluación neurológica, análisis de biopsias, etc.

El diagnóstico bioquímico de estas patologías se realiza a través de diferentes métodos, alguno de los cuales son orientativos y otros confirmatorios. Entre los métodos orientativos se cuenta con la determinación de sustratos en suero u orina (glicosaminoglicanos, oligosacáridos, sulfátidos), y la búsqueda de rasgos distintivos en los tipos celulares afectados por microscopía o ultramicroscopía. La medida de actividad enzimática es el método confirmatorio para las EL debidas a deficiencias enzimáticas. Las muestras de referencia ("*gold standard*") para esta determinación son los leucocitos o los fibroblastos obtenidos a partir de cultivo de biopsia de piel.

El diagnóstico se puede complementar con el estudio genético molecular, que se realiza sobre ADN o ARN aislado de leucocitos o fibroblastos, y puede incluir la búsqueda de mutaciones conocidas, o la amplificación y secuenciación de DNA complementario, exones o regiones completas para identificar las mutaciones patogénicas. La información obtenida por

**Tabla 1:** Clasificación de las Enfermedades Lisosomales según el mecanismo de acumulación. Se incluyen varios ejemplos con su causa y órganos y sistemas afectados. Adaptado de Platt et al., 2012.

Mecanismo de acumulación lisosomal	Ejemplos de enfermedad	Proteína lisosomal deficiente (símbolo del gen)	Sustrato(s) almacenados	Principales órganos periféricos afectados	Patología del SNC
Deficiencia de actividad enzimática lisosomal (mutación de enzima lisosomal, enzima activadora o cofactor enzimático)	Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa (glicosilasparaginasa, AGA)	aspartilglucosamina (N-acetilglucosaminil-asparagina)	Esqueleto, tejido conectivo	+
	Enf. de Fabry	$\alpha$ -Galactosidasa A (GLA)	Globotriaosilceramida, globotriaosilesfingosina	Riñón, corazón, sistema vascular	-
	Enf. de Gaucher tipo 1, 2, y 3	$\beta$ -Glucocerebrosidasa (GBA)	Glucosilceramida, glucosilsesfingosina	Bazo/hígado, médula ósea, hueso	+
	Gangliosidosis GM1	$\beta$ -Galactosidasa (GLB1)	Gangliósido GM1, oligosacáridos	Esqueleto, corazón	+
	Enf. de Krabbe (Leucodistrofia de células globoides)	Galactocerebrosidasa (GALC)	Galactosilceramida	Corazón	+
	Leucodistrofia metacromática	Arlisulfatasa A (ARSA)	Sulfogalactosilceramida		+
	Mucopolisacaridosis	Enzimas involucradas en el catabolismo de mucopolisacáridos	Mucopolisacáridos	Cartílago, hueso, corazón, pulmones	+
	Deficiencia múltiple de sulfatasas	SUMF1 (enzima generadora de formilglucina, necesaria para activar sulfatasas)	Múltiples, incluyendo glicosaminoglicanos sulfatados	Bazo/hígado, hueso, piel	+
	Enf. de Pompe	$\alpha$ -Glucosidasa (GAA)	Glucógeno	Músculo esquelético	-
Defecto en el tráfico de enzimas lisosomales	Enf. de Sandhoff	$\beta$ -hexosaminidasa A y B (HEXB)	Gangliósido GM2		+
	Mucopolipidosis tipo II (enf. de células I) y Mucopolipidosis tipo IIIA (polidistrofia pseudo-Hurler)	N-acetilglucosamina fosforil transferasa $\alpha/\beta$ (GNPTAB)	Carbohidratos, lípidos, proteínas	Esqueleto, corazón	+ (II) +/- (IIIA)
Defectos en proteínas lisosomales solubles no enzimáticas	Enf. de Niemann-Pick tipo C2	NPC2 (proteína soluble lisosomal que se une a colesterol)	Colesterol y esfingolípidos	Hígado	+
Defectos en proteínas lisosomales de membrana	Cistinosis	Cistinosin (transportador de cisteína, CTNS)	Cistina	Riñón, ojo	-
	Enf. de Danon	Proteína de membrana asociada a lisosomas 2, variante de <i>splicing</i> A (LAMP2)	Glucógeno y otros componentes autofágicos	Músculo cardíaco y esquelético	+
	Desorden de almacenamiento de ácido siálico libre	Sialina (transportador de ácido siálico, SLC 1 7A5)	Ácido siálico libre	Hígado/bazo, esqueleto	+
	Mucopolipidosis IV	Mucopolipina-I (MCOLN1)	Mucopolisacáridos y lípidos	Ojo	+
	Enf. de Niemann-Pick tipo C1	NPC1 (proteína de membrana involucrada en el transporte de lípidos)	Colesterol y esfingolípidos	Hígado	+
Desórdenes lisosomales de etiología no elucidada	Lipofuscinosis cerioide neuronal (NCLs, incluyendo la enf. de Batten)	Grupo diverso de enfermedades con defectos genéticos en genes aparentemente no relacionados, muchos de los cuales no están asociados al sistema lisosomal. Se desconoce si estos genes cooperan en vías celulares comunes.	La lipofuscina autofluorescente es una característica común, con signos clínicos convergentes (por ej. defectos visuales/ceguera)		+

estas técnicas, además de confirmar el diagnóstico, puede servir además para el consejo genético e incluso para evaluar las opciones de tratamiento (Filocamo y Morrone, 2011).

Los tipos celulares afectados en cada enfermedad, así como los órganos comprometidos son particulares de cada patología. La acumulación intralisosomal de uno o más compuestos no permite explicar completamente la fisiopatología subyacente en ellas, pudiendo existir una serie de eventos moleculares asociados a la alteración lisosomal que, en conjunto, producirían el fenotipo observado en cada patología (Cox y Cachón-González, 2012).

El amplio espectro de manifestaciones clínicas que se observan en esta familia de patologías hace difícil describirlas en conjunto. Sin embargo, se ha sugerido la existencia de rasgos comunes a muchas de ellas, lo que permitiría abordarlas conjuntamente en algunos aspectos, y, por otra parte, trasladar los hallazgos científicos realizados en una de ellas a otra con la que comparta características similares. Existen, sin embargo, excepciones a estas generalidades que obligan a realizar estas comparaciones con cierta cautela. Como ejemplo: si bien las vías asociadas al estrés del retículo endoplásmico se han visto activadas en gangliosidosis GM1 y GM2, en enfermedad de Niemann-Pick tipo C y en la mayoría de las lipofuscinoses ceroides neuronales, no se ha encontrado evidencia de su activación en varios modelos de las variantes neuronales de enfermedad de Gaucher (Farfel-Becker et al., 2009a; Vitner et al., 2010).

En particular, para explicar la fisiopatología de varias EL se sugirió hace ya dos décadas la existencia de una estimulación crónica del sistema inmune (Shoenfeld et al., 1982). Esta respuesta inmune generaría una reacción inflamatoria que ocasionaría el daño celular y tisular. Diferentes estudios en la enfermedad de Gaucher han mostrado una expresión aumentada de citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , sCD14 (Barak et al., 1999; Hollak et al., 1997; Hong et al., 2006). En modelos de las enfermedades de Niemann Pick Tipo C (Wu et al., 2005), Tay-Sachs, Sandhoff y mucopolisacaridosis (Simonaro et al., 2001) se ha encontrado un estado inflamatorio, como responsable de la fisiopatología observada. Además, se ha observado un aumento de apoptosis en diferentes desórdenes (Hong et al., 2004; Moore et al., 2008; Simonaro et al., 2001).

El rol que tienen las alteraciones de los mecanismos de autofagia en las EL se ha puesto de manifiesto en los últimos años (Ballabio, 2009; Settembre et al., 2008; Sun y

Grabowski, 2010; Vitner et al., 2010). Los lisosomas juegan un rol central en el procesamiento y depuración de sustratos celulares de las múltiples rutas que existen dentro del sistema endosómico-autofágico-lisosomal (SEAL). En este sistema están involucrados alrededor de 470 genes que constituyen la llamada red CLEAR (*coordinated lysosomal expression and regulation*, expresión y regulación coordinada lisosomal). Los genes que conforman esta red participan en la biogénesis y funcionamiento de las vías que conforman el SEAL, y se hallan controlados por un regulador maestro, el factor de transcripción TFEB (TFEB) (Palmieri et al., 2011; Settembre et al., 2011). En este contexto, los lisosomas son compartimientos que entran en ciclos de fusión y fisión con endosomas tardíos y autofagosomas, aportando enzimas para la degradación de los sustratos endocitados y fagocitados. Bajo condiciones fisiológicas, los endolisosomas y autolisosomas son organelas transientes.

En las EL, la acumulación de un sustrato primario por una deficiencia genética en particular puede repercutir de manera severa en la función del SEAL. Cuando una sustancia se acumula en los auto- y endolisosomas, puede inhibir enzimas catabólicas y transportadores, lo cual resulta en una acumulación secundaria de sustratos (Lamanna et al., 2011; Prinetti et al., 2011; Walkley y Vanier, 2009). Esta acumulación de sustratos primarios y secundarios puede desencadenar una cascada de eventos que tienen efectos no solo en el SEAL, sino en otras organelas (mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, peroxisomas, etc.), y en la función celular en general.

Se han identificado y descrito para más de quince EL una amplia variedad de alteraciones de las vías de fagocitosis y autofagia (Lieberman et al., 2012), por lo que incluso se ha llegado a considerar estas patologías como “desórdenes de la autofagia” (Settembre et al., 2008). Particularmente, en la EF se ha descrito un bloqueo en la maduración de las vesículas autofágicas en biopsias renales de pacientes (Chévrier et al., 2010).

Hasta el año 1991, el único tratamiento existente para las EL era paliativo de las manifestaciones clínicas. A partir de ese momento surge el primer tratamiento específico, denominado terapia de reemplazo enzimático (ERT, *Enzyme Replacement Therapy*), consistente en la infusión intravenosa de la enzima recombinante, para la enfermedad de Gaucher. Este hito desencadenó un auge en cuanto a nuevas terapias para otras enfermedades de este grupo, lo que produjo una revolución, generando numerosos estudios

de investigación clínica y básica. Al momento actual, existen terapias basadas en reemplazo enzimático disponibles comercialmente para seis EL (enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, MPS I, MPS VI, MPS II y enfermedad de Pompe). Existen además, otros enfoques terapéuticos. Uno de ellos se denomina inhibición de síntesis sustrato, y consiste en una terapia oral que apunta a reducir la acumulación lisosomal gracias a inhibir la ruta de síntesis de la sustancia acumulada (Abe et al., 2000; McEachern et al., 2007). Otro enfoque es la terapia con chaperonas químicas, que son moléculas pequeñas que logran mejorar el plegamiento y estabilizar la enzima mutada, impidiendo su degradación en el retículo endoplásmico. De esta manera, estas moléculas permiten la llegada de la enzima al lisosoma, donde cumple su función con la actividad enzimática residual que aún posea (Ishii et al., 2007; Yam et al., 2006). El uso de chaperonas puede aplicarse a casos de pacientes cuyas mutaciones sean las de cambio de sentido (*missense*), aunque no todas las mutaciones son respondedoras a estos fármacos.

Recapitulando, si bien el desencadenante primario de la fisiopatogenia de las EL es el depósito lisosomal, la manera en que esa acumulación genera las alteraciones celulares, tisulares y orgánicas, y en última instancia las manifestaciones clínicas, es un tema que requiere aún de investigación. Es imperativo, también, encontrar las causas de la irreversibilidad de esas alteraciones orgánicas. Conocer estos mecanismos fisiopatogénicos ayudaría a poder controlarlos y manejarlos desde el punto de vista terapéutico con el fin de reducirlos, detenerlos o en el mejor de los casos, revertirlos. Dentro del complejo y amplio abanico de las EL, en este trabajo nos concentraremos específicamente en el estudio de la Enfermedad de Fabry.

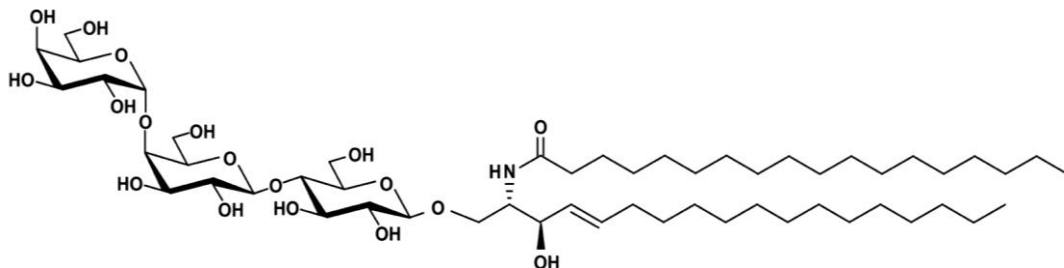
## La Enfermedad de Fabry

La Enfermedad de Fabry (EF) es una patología lisosomal causada por la deficiencia de la actividad de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ Gal, EC 3.2.1.22) (Brady et al., 1967), lo cual produce la acumulación de glicolípidos complejos, principalmente globotriaosilceramida ( $\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}\beta \rightarrow \text{Cer}$ , Gb<sub>3</sub>, **Figura 1**) (Kint, 1970). La incidencia es de 1/40.000 a 1/117.000 varones nacidos vivos. Esta deficiencia se debe a mutaciones en el gen GLA, localizado en el cromosoma X, que codifica para dicha enzima. La herencia de la enfermedad

es ligada al X, con un patrón que no es ni recesivo ni dominante. La penetrancia de la EF en mujeres heterocigotas es considerablemente alta: alrededor del 70% de las pacientes presenta alguna manifestación clínica de la enfermedad (Rozenfeld, 2009).

La expresión clínica y la variabilidad fenotípica en las mujeres heterocigotas se explica por el fenómeno de lyonización (inactivación) al azar de uno de los cromosomas X en las células (Pinto et al., 2010; Whybra et al., 2001). Como resultado de este proceso, las mujeres presentan un mosaico celular donde se ven reflejadas dos poblaciones distintas, que expresan los genes de origen paterno o materno. Ya que las células que expresan el alelo normal de  $\alpha$ Gal no pueden revertir el fenotipo de las que expresan el alelo mutado, la relación numérica entre ambos tipos celulares es la que en definitiva determina la severidad del fenotipo presentado por las mujeres con EF. La edad al comienzo de los síntomas en mujeres es generalmente mayor y más variable que para los hombres, y las manifestaciones son más diversas.

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad comienzan en la niñez, y se caracterizan por la aparición de acroparestesias, que se manifiestan como ataques episódicos de dolor quemante en pies y manos, dolor gastrointestinal, hipohidrosis/anhidrosis, angioqueratomas aislados (Ries et al., 2005). Alrededor de los 20 años de edad, se observan angioqueratomas agrupados en zonas específicas (ombligo, “traje de baño”, mucosas), proteinuria, ataques de fiebre, edemas, intolerancia al calor y ejercicio. Una forma de opacidad corneal, cornea



**Figura 1:** Estructura de la globotriaosilceramida ( $Gb_3$ ). Nótese que existe una variabilidad estructural en esta molécula, que viene dada por los diferentes ácidos grasos que pueden estar esterificados a la esfingosina para dar la porción de ceramida (en el ejemplo se ilustra un residuo del ácido esteárico). Por lo tanto, el término  $Gb_3$  se refiere en realidad a un colectivo de especies químicas que difieren en el residuo de acilación.

verticillata, es un hallazgo oftalmológico común en la EF, pero no tiene efectos sobre la visión. Hay manifestaciones auditivas y vestibulares, que incluyen tinnitus, pérdida de la audición y vértigo. Los pacientes también sufren de cefalea, y los estudios psiquiátricos muestran una incidencia alta de depresión severa.

En los varones afectados, alrededor de la cuarta década de la vida aparecen complicaciones clínicas que pueden llevar a la muerte: insuficiencia renal crónica, con disminución gradual de la tasa de filtración glomerular y aumento de la proteinuria, hipertrofia ventricular cardíaca y accidentes cerebrovasculares. La expectativa de vida de los hemicigotas se encuentra reducida en 20 años con respecto a la población general (MacDermot et al., 2001). En las mujeres, las complicaciones severas están más frecuentemente asociadas a la enfermedad cardíaca y los accidentes cerebrovasculares. La expectativa de vida para las mujeres es de 70 años, 15 años menos que para la población general femenina.

Los pacientes con la forma clásica de la enfermedad tienen una actividad de  $\alpha$ Gal muy baja o casi nula. Existen también variantes más leves o de comienzo tardío, con manifestaciones que se circunscriben a un solo órgano, tales como la variante cardíaca o la variante renal (Nagao et al., 1991; Nakao et al., 1995).

Hasta hace unos años, como ocurría en la mayor parte de las EL, el único tratamiento posible era paliativo. En la actualidad, los avances de la ingeniería genética han hecho posible el desarrollo de un tratamiento específico: la terapia de reemplazo enzimático, que consiste en la infusión intravenosa de la enzima alfa-galactosidasa A recombinante, cada 2 semanas (Schiffmann et al., 2001). Existen dos formas comercialmente disponibles: Agalsidasa alfa (Replagal®, Shire HGT) y Agalsidasa beta (Fabrazyme®, Genzyme) que están basadas en preparaciones enzimáticas producidas de fibroblastos humanos y en la línea celular CHO, respectivamente.

La efectividad de la ERT en diferentes órganos ha sido evaluada de manera extensa. Los reportes bibliográficos describen una clara mejoría en la calidad de vida de los pacientes y la reducción de la severidad del dolor y las manifestaciones gastrointestinales. El tratamiento estabiliza o enlentece la disminución de la función renal, y se han descripto mejorías en la hipertrofia cardíaca, con disminución de la masa ventricular izquierda. La terapia también estabiliza la progresión de las manifestaciones auditivas (Mehta et al., 2009).



Hasta el momento existen pocos estudios realizados que muestren alteraciones inmunológicas en la Enfermedad de Fabry. Las células endoteliales y leucocitos se encuentran en un estado activado y proinflamatorio (DeGraba et al., 2000; Shah et al., 2007). Escasos reportes bibliográficos muestran la existencia de autoanticuerpos en pacientes con Enfermedad de Fabry (Arias Martínez et al., 2003; Rahman et al., 1998). Un estudio realizado en nuestro laboratorio reveló una alta incidencia de autoanticuerpos en suero de pacientes con Enfermedad de Fabry (Martinez et al., 2007). La muy reciente descripción de alteraciones funcionales en linfocitos T *natural killer* (NK) invariantes (iNKT) de pacientes (Pereira et al., 2013), constituye un hallazgo novedoso, derivado originalmente de estudios en el modelo murino de la EF (descrito más adelante en este texto), y abre nuevas posibilidades para la exploración en el campo inmunológico en esta enfermedad.

Recientemente fue descrita en la literatura la observación de niveles plasmáticos aumentados de una forma deacilada de Gb<sub>3</sub>, la globotriaosilesfingosina (lysoGb<sub>3</sub>) en pacientes con EF, no detectable en individuos normales, que sería un mejor marcador clínico de la EF (Aerts et al., 2008; Rombach et al., 2010a). A concentraciones patológicas, tanto el Gb<sub>3</sub> como el lysoGb<sub>3</sub> han demostrado tener actividad sobre diferentes tipos celulares en la EF: el Gb<sub>3</sub> induce estrés oxidativo y la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, mientras que el lysoGb<sub>3</sub> activa la secreción de TGF- $\beta$  y proteínas de matriz en podocitos (Shen et al., 2008; Sanchez-Niño et al., 2011). Ambos tipos celulares son de relevancia en la descripción de las manifestaciones de la EF.

En el año 1997, se ha generado un modelo animal de EF, mediante la eliminación del gen de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A (Ohshima et al., 1997). El fenotipo en el ratón es más leve que el observado en humanos, pero este modelo ha mostrado ser de utilidad para recapitular algunas de las alteraciones que se observan en la EF, y ha sido utilizado en los estudios preclínicos de la ERT (Ioannou et al., 2001). Estos animales presentan una acumulación progresiva de Gb<sub>3</sub> dentro de los lisosomas en órganos y tejidos, como riñón, corazón, vasos sanguíneos e hígado. El modelo murino ha sido de utilidad para estudiar las modificaciones anatomopatológicas y funcionales cardíacas asociadas a la EF (Rozenfeld et al., 2011), así como las alteraciones del endotelio vascular (Heare et al., 2007), proveyendo de hipótesis plausibles para su fisiopatología (Park et al., 2009, 2008; Shu y Shayman, 2007; Shu et al., 2009). Se han podido también observar alteraciones neurofisiológicas y del comportamiento, que son

trasladables a la neuropatía periférica observada en humanos (Rodrigues et al., 2009), y alteraciones histológicas a nivel renal (Valbuena et al., 2011), aunque el modelo no presenta la disfunción renal observada en humanos. En lo que respecta al sistema inmune, se describieron anomalías numéricas y funcionales en la subpoblación de linfocitos T *natural killer* (NK) invariantes (iNKT) (Gadola et al., 2006; Macedo et al., 2012). Si bien trabajos posteriores no hallaron evidencias de alteraciones numéricas de la subpoblación iNKT en pacientes con EF (Balreira et al., 2008; Rozenfeld et al., 2009, que forma parte de este trabajo), muy recientemente se pudieron describir alteraciones funcionales, similares a las observadas en el modelo murino, en pacientes con EF (Pereira et al., 2013).

## Hipótesis y objetivos

La hipótesis que proponemos y evaluamos a lo largo de este trabajo de tesis está centrada en la existencia de un estado proinflamatorio en la Enfermedad de Fabry, que involucra células del sistema inmune y es causado por la acumulación de globotriaosilceramida (Gb<sub>3</sub>) a nivel lisosomal. Esos depósitos de Gb<sub>3</sub> generarían el desencadenamiento de mecanismos patogénicos que producen un aumento de apoptosis y una respuesta inmune inflamatoria. Estas respuestas serían las responsables de alteraciones en los órganos blanco, que al ser crónicas y progresivas se tornan, con el tiempo, irreversibles.

El objetivo general del presente trabajo es estudiar la existencia de posibles alteraciones en el sistema inmune en el contexto de la fisiopatología de la Enfermedad de Fabry.

Como objetivos específicos de este trabajo, nos propusimos:

- 1. Analizar las subpoblaciones de leucocitos de sangre periférica de pacientes con EF.**

La finalidad es encontrar cambios en subpoblaciones leucocitarias, mediante el estudio de la expresión de marcadores de superficie y la observación de características ultraestructurales.

**2. Analizar marcadores leucocitarios relacionados con un posible estado proapoptótico.**

La finalidad es analizar la existencia de un estado proapoptótico en las células del sistema inmune por medio del análisis de marcadores de apoptosis, estudiar sus posibles causas, y correlacionar dichos resultados con la fisiopatología de la enfermedad.

**3. Profundizar el estudio de un posible estado proinflamatorio presente en la enfermedad.**

La finalidad es evaluar los marcadores proinflamatorios que se podrían encontrar elevados en las células inmunes en la Enfermedad de Fabry, indagar la causa de dicho cambio y su efecto en la patología.

## Materiales y métodos

### Pacientes

Se incluyeron para este trabajo muestras de sangre de pacientes con Enfermedad de Fabry, tanto varones como mujeres (n=43, rango de edades: 3 - 74 años). El diagnóstico de la enfermedad de Fabry se estableció mediante examen clínico, medida de actividad enzimática y prueba genética.

Las manifestaciones clínicas de los pacientes incluyeron angioqueratomas, acroparestesias, córnea verticillata, dolor abdominal, proteinuria e hipohidrosis. Sin embargo ninguno de los pacientes presentaba insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca o antecedentes de accidentes cerebrovasculares al momento de la participación en este estudio.

El protocolo de trabajo fue aprobado por el comité científico de AADELFA (Asociación Médica para el estudio de los trastornos lisosomales y la enfermedad de Fabry en la Argentina) de acuerdo con lo dispuesto en la Declaración de Helsinki en 1995. La naturaleza y el propósito del estudio se explicaron a todos los voluntarios y todos los pacientes, quienes dieron su consentimiento informado antes de participar en este estudio.

Veinticuatro pacientes se hallaban bajo terapia de reemplazo enzimático (ERT) con Agalsidasa alfa (Replagal®, Shire Human Genetic Therapies, Cambridge, MA, EE.UU.) al momento del estudio.

Treinta y cinco individuos sanos (rango de edades: 6 - 55 años), emparejados por edad y sexo con los pacientes, sirvieron como controles.

## **Técnicas generales**

### **Extracción y procesamiento inicial de las muestras de pacientes**

De cada participante se obtuvo una muestra de sangre periférica (10 ml) por punción venosa, con heparina como anticoagulante, y se procesó inmediatamente. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron por separación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077®, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.)

En el caso particular de las muestras usadas en los estudios de marcadores de superficie de leucocitos, el volumen recolectado fue de 5ml usando EDTA como anticoagulante, y se trabajó con la sangre entera, como se describe más abajo.

### **Cultivo celular**

Todos los cultivos celulares realizados en este trabajo se llevaron a cabo en estufas de cultivo Forma Scientific termostatzadas a 37 °C, con 5 % CO<sub>2</sub> y humedad constante. Se utilizaron placas de cultivo de 6, 24, 48 o 96 fosas (*wells*), y botellas T25 y T75 (Cellstar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania).

Se utilizó el medio de cultivo sintético libre de suero AIM-V® CTS™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) salvo indicación contraria.

### **Medidas de Expresión Génica**

#### ***Diseño de cebadores (primers)***

Los cebadores (*primers*) utilizados para la determinación de expresión génica fueron diseñados mediante el programa PerlPrimer. Se buscaron secuencias con una temperatura de *melting* de alrededor de 60 °C y una longitud de 20-22 pb. Se verificó la especificidad de las secuencias elegidas mediante la herramienta Primer-BLAST del *National Center for Biotechnology Information (NCBI, National Library of Medicine, National Institutes of Health, EE.UU., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)*, y se comprobó la ausencia de

estructuras secundarias en las zonas de hibridación de la secuencia blanco de cDNA mediante la herramienta bioinformática mFold (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::mfold>) (Zuker, 2003). Para todos los cebadores se realizó una curva de eficiencia en qPCR con controles positivos apropiados y se verificó el tamaño del amplicón por electroforesis en gel de agarosa. Las secuencias de los cebadores utilizados en el presente trabajo se indican en la **Tabla 2**.

### *Extracción y retrotranscripción (RT) de ARN*

La extracción de ARN se realizó mediante kits de columnas MiniSpin® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y se retrotranscribieron utilizando como cebadores una mezcla de hexámeros generados al azar y un kit de reactivos de RT (M-MLV RT®, dNTPs, DTT, RNase-Out® y First-Strand® buffer) según las especificaciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), utilizando el siguiente programa: 10' a 25 °C, 50 a 37 °C, 15' a 70 °C. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

### *PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)*

La determinación de expresión génica sobre muestras de ADN complementario (cDNA) se realizó en un termociclador iQ5 (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) por qPCR con SYBR Green, utilizando una mezcla de reacción compuesta por 10 µl de cDNA, 1 µl de cada primer (forward y reverse), y 12 µl de iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.). El programa de reacción utilizado fue: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 50 ciclos de 15 s a 95 °C y 60 s a 60 °C, con una curva final de desnaturalización (*melting*) de 55 °C a 95 °C (en pasos de 0,5 °C/10 s). Las medidas se realizaron por duplicado por cada gen y muestra.

Para el cálculo del nivel expresión de un gen de interés (GDI) en particular se utilizó el gen de β-actina (ACTB) como normalizador interno en cada muestra, y utilizando los valores promedio de ciclo al punto de intersección (Ct, *cycle threshold*) obtenidos para ambos genes se calculó la expresión (en unidades arbitrarias) según la fórmula:

$$Exp_{GDI} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{gdi} - Ct_{ACTB})}$$

**Tabla 2:** Secuencia de los cebadores (primers) utilizados para la determinación de expresión génica por qPCR

Gen	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')
<b>ACTB</b>	CCTGGCACCCAGCACAAT	GCCGATCCACACGGAGTACT
<b>EDEM1</b>	TCCTGACACCAATAATGAGAC	ACGACATTGCCTAGTAATCC
<b>IFNG</b>	CCAACGCAAAGCAATACATGA	TTTTTCGCTTCCCTGTTTTAGC
<b>IL1A</b>	TCCCAATCTCCATTCCCAA	AGCCCCGGGAGGTATGC
<b>IL1B</b>	GCACGATGCACCTGTACGAT	AGACATCACCAAGCTTTTTTGCT
<b>IL4</b>	CGACTGCACAGCAGTTCCA	AGGTTCTGTGCGAGCCGTTT
<b>IL6</b>	CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTAT	GCGCTTGTGGAGAAGGAGTT
<b>TNF</b>	GGAGAAGGGTGACCGACTCA	TGCCCAGACTCGGCAAAG
<b>DDIT3</b>	GACTTAAGTCTAAGGCACTG	GATACACTTCCTTCTTGAACAC
<b>HSP90B1</b>	ATCAAACCAATATGGCAGAG	CATATCATGGAAGTCGTCTG
<b>HSPA5</b>	GGTACTGCTTGATGTATGTC	GTCTTTCACCTTCATAGACC
<b>PPP1R15A</b>	CCATCTATGTACCTGGAGAG	AAATGGACAGTGACCTTCTC
<b>NLRP3</b>	GAATCTCACGCACCTTTACC	GCAGTTGTCTAATTCCAACACC
<b>PECAM1</b>	CAAGCTAGGATCATTTCTGGG	TGTAGAGAAGGATTCCGTCAC
<b>CD1d</b>	TAAGAGGCAAACCTCCTATCAG	CCTTACATCTTCAATTCTGAG
<b>HLA-DRA</b>	TCACCAATGTACCTCCAGAG	TCTATGAAACAGATGAGGACG
<b>APEX1</b>	AGGATTAGATTGGGTAAAGG	AACATTTGGTCTCTTGAAGG
<b>SOD1</b>	GAGCAGAAGGAAAGTAATGG	TGGATAGAGGATTAAAGTGAGG
<b>SOD2</b>	GAACAACAGGCCTTATTCC	CTCCCAGTTGATTACATTCC



Posteriormente, el conjunto de valores de expresión de un gen (en unidades arbitrarias) obtenidos para un experimento dado se normalizó respecto del promedio de expresión del grupo control correspondiente, obteniéndose así un conjunto de valores correspondientes a las veces de expresión (*fold increase*) respecto del grupo control.

### Citometría de Flujo

Todos los ensayos realizados por citometría de flujo se llevaron a cabo en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE.UU.) y adquiridos con el software CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE.UU.). Los análisis posteriores se realizaron en los programas CellQuest, Paint-a-Gate PRO (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE.UU.) y FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, EE.UU.).

### Métodos inmunoquímicos

#### *ELISA*

Las medidas de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ ) realizadas en sobrenadante de cultivo fueron llevadas a cabo con kits OptEIA® (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizaron placas Nunc MaxiSorp (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

#### *SDS-PAGE y Western-Blot*

Las separaciones de proteínas se realizaron en geles de poliacrilamida preparados con una concentración de monómero (T%) de 17 %. Las electroforesis se llevaron a cabo en cubas Tetra Cell (BioRad, Hercules, CA, E.E.U.U.), con una fuente Power Pac Basic (BioRad, Hercules, CA, E.E.U.U.), utilizando 25 mA y 50 mA para las fases de apilamiento y separación, respectivamente. Las electrotransferencias se realizaron en cubas MiniProtean II (BioRad, Hercules, CA, E.E.U.U.), con la misma fuente, a 70 mA, sobre membranas de nitrocelulosa (Osmonics, Westboro, MA, EE.UU.). La efectividad de la transferencia se verificó por tinción reversible con una solución de rojo Ponceau-ácido tricloroacético. Todos los bloqueos e incubaciones se realizaron con leche descremada 5 % en TBS-Tween 0,1 %, y los lavados con TBS-Tween 0,1 %. Las incubaciones con anticuerpos primarios se realizaron durante la noche, a 4 °C, mientras que las incubaciones con los anticuerpos secundarios conjugados se realizaron por 1 h a 37 °C. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia. El reactivo de

quimioluminiscencia utilizado para revelar tuvo la siguiente composición: 0,25 mM luminol (Fluka, St Louis, MO, EE.UU.), 0,2 mM ácido p-cumárico (Fluka, St Louis, MO, EE.UU.), 2,9 mM peróxido de hidrógeno, 10 mM Tris, pH=8,8. Se utilizaron placas fotográficas Amersham HyperFilm MP (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), y se revelaron y fijaron de manera manual utilizando reactivos fotográficos Romek (Gamaxa SRL, Avellaneda, Argentina), según instrucciones del fabricante.

### Microscopía electrónica de transmisión (MET)

La preparación de las muestras para microscopía electrónica se realizó centrifugando las células de interés, descartando el sobrenadante y fijando con glutaraldehído 2 % en buffer fosfato (0,2 M; pH=7,4) a 4 °C por dos horas. Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con buffer fosfato a 4 °C, centrifugadas y remitidas para su acondicionamiento.

El procesamiento posterior de las muestras fue llevado a cabo en el Servicio Central de Microscopía Electrónica, dependiente de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, donde se realizaron las tinciones de contraste, la inclusión en tacos, los cortes finos y ultrafinos, y las observaciones finales.

El equipo utilizado para las observaciones fue un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200EX II (Jeol)

### Estadística

Los análisis estadísticos realizados en esta tesis fueron llevados a cabo con los programas Statistica® (StatSoft, Tulsa, OK, EE.UU.) y Prism® (Graphpad, San Diego, CA, EE.UU.)

Los estadísticos particulares utilizados en cada caso se indican en las figuras correspondientes. Salvo indicación contraria, se los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## Técnicas específicas

### Análisis de subpoblaciones de leucocitos y expresión de marcadores de superficie

Partiendo de alícuotas de 50 µl de sangre periférica, se realizó una marcación con anticuerpos durante 30 min, en hielo y oscuridad. Luego se lisaron los glóbulos rojos mediante el agregado de una solución lisante comercial (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) y una incubación posterior en hielo por 10 min. Las células marcadas se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron, y se procedió a la adquisición de eventos en el citómetro de flujo.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados a fluorocromo, todos de origen murino y especificidad anti-humano: CD4-FITC, CD8-PE, CD3-PerCP, CD56+16-PE, CD19-PerCP, Lin1-FITC, HLA-DR-PE, CD11c-PerCP, CD123-PerCP, CD14-FITC, HLA DR-FITC, CD31-PE, CD1d-PE (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) y TCR Vα24-FITC (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.). La marcación intracelular con CD77(Gb<sub>3</sub>)-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) se realizó luego de llevar a cabo una fijación y permeabilización de la muestra con Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.), según las indicaciones del fabricante. Los linfocitos, monocitos y granulocitos se identificaron y seleccionaron según sus características de dispersión frontal y lateral de luz (*forward scatter/sideways scatter*, FSC/SSC).

De cada muestra se adquirieron 10<sup>5</sup> eventos. Para determinar si las muestras eran positivas o negativas para cada marcador en particular, el valor de intensidad de fluorescencia media (MFI) obtenida en la muestra para ese marcador fue comparado con el valor de MFI obtenido con los controles de isotipo correspondientes para cada caso.

### Apoptosis en PBMC en la Enfermedad de Fabry

#### *Apoptosis por TUNEL*

La marcación por la técnica de TUNEL (Promega, Madison, WI, EEUU) se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, un millón de células mononucleares obtenidas de pacientes con EF o controles normales fueron fijadas con paraformaldehído 1 % a 4 °C por 20 minutos. Luego de lavar las células con PBS, se agregó etanol 70 % y se incubaron a

-20 °C por al menos 4 hs. Luego de un lavado, se agregó buffer de equilibración y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 300g, se descartó el sobrenadante y se agregó una mezcla de reacción compuesta por la rTDT (Deoxinucleotidil Transferasa Terminal recombinante) y una mezcla de nucleótidos que contiene fluoresceína-12-dUTP. Se incubó a 37 °C por una hora, resuspendiendo cada 15 minutos, y se detuvo la reacción con 20 mM EDTA. Luego se permeabilizaron las células mediante la adición de una solución de Tritón 0,1 % con 5 mg/ml de BSA en PBS. Posteriormente se centrifugaron las células y se agregó una solución de ioduro de propidio con 250 µg de RNasa A (DNasa-free), y se incubó por 30 minutos. El porcentaje de células positivas para TUNEL y la MFI se analizaron por citometría de flujo.

Las células mononucleares fueron identificadas y seleccionadas de acuerdo a las características de *forward scatter/sideways scatter* (FSC/SSC). Para cada muestra se adquirieron 10<sup>5</sup> eventos. El porcentaje de células positivas se determinó usando un control negativo para fijar el umbral de referencia. Para cada muestra de paciente Fabry, al menos un control normal se procesó en paralelo en la misma corrida. Para validar este procedimiento, se evaluó la variabilidad intra-corrida realizando corridas por cuadruplicado en muestras control tanto para el ensayo de Anexina V como para el de TUNEL.

#### ***Apoptosis por Anexina V***

Una alícuota de 50 µl de sangre entera se colocó en un tubo de citometría, y se le agregaron 300 µl de buffer de unión (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, pH=7.40), 2 µl de Anexina V-FITC (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE.UU.) y 1 µl de ioduro de propidio (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.). Luego de una incubación de 30 min a 4 °C en oscuridad, se analizaron las muestras por citometría de flujo. Se identificaron y seleccionaron las células mononucleares de acuerdo a las características de *forward scatter/sideways scatter* (FSC/SSC), y se calculó el porcentaje de células positivas para Anexina V y la MFI correspondiente.

Cuando la técnica se aplicó a PBMC en cultivo, se centrifugaron las células a baja velocidad, se resuspendieron en un pequeño volumen de PBS y se prosiguió el protocolo de igual manera que con la sangre entera.

### *Despolarización de membrana mitocondrial por JC-1*

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) fueron medidos mediante el uso de JC-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), un fluorocromo catiónico lipofílico que forma agregados J (*J-aggregates*) que producen un cambio batocrómico en el espectro de absorción del compuesto a altas concentraciones. Las PBMC de controles normales expuestas *in vitro* a Gb<sub>3</sub> fueron incubadas por 30 minutos a 37 °C en medio de cultivo en presencia de JC-1 2  $\mu$ M. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y analizadas por citometría de flujo. La despolarización de la membrana mitocondrial se evaluó calculando el cociente entre las fluorescencias verde y roja para cada evento individual, y luego midiendo el porcentaje de células por encima de un valor umbral y calculando la media geométrica del parámetro derivado.

### *Determinación de caspasas por immunoblotting*

Se obtuvieron lisados proteicos partiendo de células enteras mediante homogeneización de PBMC de pacientes con EF o controles normales en una solución compuesta por 10 mM HEPES pH=7,9, 1 mM EDTA, 60 mM KCl, 0,2 % Nonidet P40, 1 $\mu$ M DTT, 1  $\mu$ M PMSF, 0,1  $\mu$ g/ml aprotinina (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.), 0,1  $\mu$ g/ml leupeptina (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.), 1  $\mu$ M vanadato de sodio y 5  $\mu$ M NaF. El contenido total de proteínas se determinó usando el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, Pierce Laboratories, Rockford, IL), se separaron 10  $\mu$ g de proteína total de cada muestra por SDS-PAGE, y se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa. Las muestras fueron sembradas en pares de un paciente y un control, y procesadas juntas. Las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales primarios específicos para caspasa 3 (Cell Signaling, Danvers, MA, EE.UU.), caspasa 8 (Cell Signaling, Danvers, MA, EE.UU.), caspasa 9 (Cell Signaling, Danvers, MA, EE.UU.), caspasa 12 (Affinity bioreagents, Rockford, IL, EE.UU.), caspasa 4 (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.), seguidos de un anticuerpo secundario específico de la porción Fc del anticuerpo primario y conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), y luego revelados por quimioluminiscencia. Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) como control de carga.

### *Tratamientos in vitro de PBMC*

PBMC de voluntarios normales se resuspendieron en AIM-V y se sembraron a  $10^6$  células/fosa en placas de 96 fosas, con el agregado de cantidades variables (hasta 40  $\mu$ M) de Gb<sub>3</sub> (Matreya, Pleasant Gap, PA, EE.UU.) en DMSO, o DMSO solo como control de vehículo (la concentración final de DMSO fue 0,1 %). Se incubaron a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> por diferentes tiempos.

Los experimentos de control donde se inhibió la  $\alpha$ Gal se realizaron incubando previamente las PBMC por 24 h con 200 $\mu$ M DGJ (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) antes del agregado de Gb<sub>3</sub>. Los experimentos de especificidad se realizaron reemplazando Gb<sub>3</sub> con glucosilceramida (Matreya, Pleasant Gap, PA, EE.UU.).

Para el agregado de Gb<sub>3</sub> o glucosilceramida como complejos con seroalbúmina bovina (BSA), previamente a la adición a los cultivos, se incubó por 30 min a 37 °C una solución de BSA en PBS con el agregado del glicolípido correspondiente (o sólo el vehículo para los controles), de forma tal de mantener una relación equimolar entre el glicolípido y la proteína

Luego de cualquiera de estos tratamientos, se aplicaron las técnicas de Anexina V, TUNEL y JC-1 de manera similar a las descriptas anteriormente.

### *Marcadores de estrés de RE y estrés oxidativo por qPCR*

Para obtener controles positivos de activación de cada uno de los genes asociados a estrés de RE estudiados, se utilizaron PBMC tratadas con thapsigargina 1  $\mu$ M por 1 h.

Por su parte, los controles para estrés oxidativo se generaron mediante el agregado de peróxido de hidrógeno 100  $\mu$ M en cultivos de PBMC, con una posterior incubación de 4 h.

## Perfil proinflamatorio en la Enfermedad de Fabry

### *Análisis de producción y expresión de citoquinas en PBMC*

PBMC aislados de pacientes Fabry y controles normales fueron centrifugadas, y su ARN total fue aislado y retrotranscripto siguiendo las técnicas antes descriptas. Mediante qPCR se determinó la expresión de los genes IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Los valores obtenidos se

expresaron como veces de aumento (*fold increase*) de las muestras de pacientes Fabry comparadas con las provenientes de controles normales.

Por otra parte, alícuotas de las mismas muestras fueron sembradas en placas de 96 fosas a  $5 \times 10^5$  células/fosa en 300  $\mu$ l de medio AIM-V y cultivadas a 37 °C, con 5 % CO<sub>2</sub> por 24hs. En el sobrenadante de estos cultivos se determinaron las concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-13 e IL-10 mediante ELISA de captura (BD OptEIA®, BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.)

#### *Determinación de citoquinas intracitoplasmáticas en PBMC*

Partiendo de PBMC de 6 pacientes Fabry y 4 controles normales, se sembraron  $1 \times 10^6$  células/fosa en 300  $\mu$ l de AIM-V en placas de 96 fosas, y se realizó un cultivo de 14 hs en presencia de 1  $\mu$ g/ml brefeldina A (GolgiPlug, BD BioSciences, San Jose, CA, EE.UU.), con o sin el agregado de LPS 1  $\mu$ g/ml como estímulo proinflamatorio. Posteriormente se procedió a lavar las células con PBS, incubarlas por 10 min a 4 °C con PBS con 10 % suero humano inactivado, y se agregaron diferentes anticuerpos para realizar la marcación de superficie: LIN1 y HLA-DR para evidenciar células dendríticas (LIN1<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup>); y CD3, CD56 y CD14 para distinguir monocitos (CD14<sup>+</sup>) y células NK (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>). Finalmente, las células fueron fijadas y permeabilizadas con Cytofix/Cytoperm® (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) siguiendo el protocolo del fabricante, se llevó a cabo una marcación intracitoplasmática para IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , se lavó y se analizó mediante FACS.

#### *Análisis de producción de citoquinas en THP-1 tratadas con Gb<sub>3</sub>/DGJ/LPS*

Se mantuvieron cultivos de la línea monocítica humana THP-1 en medio DMEM-Glutamax™ (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) con 10 % SFB (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), en presencia o ausencia de DGJ 200  $\mu$ M (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.), por 6 días. Posteriormente se resuspendieron en AIM-V y sembraron  $5 \times 10^5$  células en fosas de 500  $\mu$ l manteniendo la concentración anterior de DGJ, con o sin el agregado de Gb<sub>3</sub> 20  $\mu$ M (Matreya, Pleasant Gap, PA, EE.UU.) o LPS 1  $\mu$ g/ml. Luego de 24 hs de cultivo se separó el sobrenadante y se determinó la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  por ELISA de captura (OptEIA®, BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.).

### *Diferenciación de monocitos a células dendríticas o macrófagos y análisis de citoquinas producidas por tratamiento con Gb<sub>3</sub>/DGJ/LPS*

A partir de concentrados leucoplaquetarios (*buffy coats*) de donantes normales con serología no reactiva (obtenidos a través del servicio de Hemoterapia de La Plata) previamente diluidos 1:4 con SF se separaron PBMC mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque, con dos lavados posteriores en SF a 300 g y 100 g para eliminar plaquetas.

Para obtener cultivos enriquecidos en monocitos, se resuspendieron en AIM-V las PBMC obtenidas, se sembraron botellas T-75 con  $50 \times 10^6$  células, se las incubó a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> por 1 h, y se realizaron dos lavados consecutivos con SF para eliminar las células no adheridas. Se agregó nuevamente medio de cultivo a las células así obtenidas y se adicionaron rh-GM-CSF 36 ng/ml y rh-IL-4 20 ng/ml, o rh-M-CSF 30 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, E.E.U.U.), para diferenciarlas a DC o MF, respectivamente. Estos cultivos se mantuvieron por 6 días, al cabo de los cuales se cosecharon las células. En este punto se realizaron controles de diferenciación y pureza mediante citometría de flujo marcando con HLA-DR, LIN1 y CD1a.

Las células diferenciadas fueron resuspendidas en AIM-V libre de factores recombinantes y sembradas a  $10^6$  células/fosa de 500  $\mu$ l, y con y sin el agregado de Gb<sub>3</sub> 20  $\mu$ M (o DMSO como control de vehículo), DGJ 200  $\mu$ M y/o LPS 1  $\mu$ g/ml. Luego de 24 hs de cultivo se separó el sobrenadante y se determinó la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  mediante ELISA de captura.

### *Bloqueo de TLR-4 en cultivos de macrófagos tratados con Gb<sub>3</sub>/DGJ*

Partiendo de macrófagos diferenciados desde concentrados leucoplaquetarios como se indicara anteriormente, se trataron previamente las células en AIM-V por 30 min con 10  $\mu$ g/ml de un anticuerpo bloqueante para TLR-4 (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.) o su control de isotipo, y luego se realizó un cultivo de 14 hs con el agregado de Gb<sub>3</sub> 20  $\mu$ M y DGJ 200  $\mu$ M, o DMSO 0,1 % como control de vehículo. Posteriormente se determinaron en el sobrenadante las concentraciones de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  por ELISA de captura



## Caracterización de leucocitos en la Enfermedad de Fabry

### Introducción

La Enfermedad de Fabry (EF) se caracteriza por la deficiencia de la enzima lisosomal  $\alpha$ Gal, cuyo principal sustrato es el glicolípido globotriaosilceramida ( $\text{Gb}_3$ , que coincide con el marcador de superficie linfocitario nombrado como CD77). La acumulación de  $\text{Gb}_3$  en diferentes tejidos en la EF (corazón, vasos sanguíneos, riñón, sistema nervioso, tracto gastrointestinal y conjuntiva ocular) está bien documentada. Sin embargo, no existían estudios que analizaran la acumulación de  $\text{Gb}_3$  en leucocitos en la EF. Los efectos de esta acumulación sobre la dinámica celular y el metabolismo lipídico en los leucocitos podrían tener un impacto en la función celular y en el sistema inmune en general.

Los glicolípidos tienen la capacidad de comportarse como antígenos, y pueden ser presentados a células T NK (NKT) por células presentadoras de antígeno (CPA) en el contexto de la molécula CD1d (Spada et al., 1998). Las células NKT son un subconjunto de células T que co-expresan marcadores típicos de células T activadas y células NK, y cuyo receptor de célula T (TCR) está constituido por la cadena invariante  $\text{V}\alpha 24\text{-J}\alpha 18$  combinada con un repertorio limitado de cadenas  $\text{V}\beta$  (Bendelac et al., 1997). Las células NKT invariantes tienen una capacidad única de secreción de IL-4 e IFN- $\gamma$  cuando reconocen al complejo glicolípido-CD1d.

La  $\alpha$ -galactosilceramida es uno de los ligandos más potentes conocidos de estas células, pero no tiene ocurrencia en mamíferos. Sin embargo, recientemente se han identificado otros ligandos lipídicos de origen endógeno en mamíferos, incluyendo esfingolípidos como la glucosilceramida (Brennan et al., 2011; Facciotti et al., 2012).

La molécula CD1d pertenece a una familia de glicoproteínas similares a las del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, y está involucrada en las vías de presentación antigénica independientes de MHC. CD1d realiza el muestreo de antígenos glicolipídicos en compartimientos endosómicos de reciclaje y lisosomas, que contienen repertorios lipídicos diferentes entre sí. Luego de su síntesis en el RE, CD1d accede a estos compartimientos celulares tras cumplir un ciclo que incluye el pasaje por el aparato de Golgi, un tránsito a membrana plasmática y la posterior reinternalización por endocitosis (Sugita et al., 2004).

Aunque la presentación de péptidos por parte de moléculas del MHC clase II podría encontrarse inalterada en diferentes modelos de EL, el procesamiento y/o presentación de glicolípidos se encuentran de hecho impedidos (Gadola et al., 2006). El glicosfingolípido isoglobotrihexosilceramida, otro sustrato de la  $\alpha$ Gal, ha sido sugerido como un ligando endógeno para las células NKT (Zhou et al., 2004), y produce una respuesta de citoquinas del perfil  $T_H1$  fuerte con producción de IFN- $\gamma$ . La acumulación de glicolípidos en el modelo murino de la EF condujo a la reducción del número de células NKT (Gadola et al., 2006), efecto que podría ser mediado por mecanismos indirectos relacionados con la acumulación de sustratos (Schümann et al., 2007).

Existe evidencia que sustentaría la asociación entre desórdenes esfingolipídicos, particularmente la enfermedad de Gaucher, e inmunopatologías, tales como mielomas, y en menor medida, linfomas y leucemias, habiendo descripciones que datan de hace más de 20 años (Burstein et al., 1987; Costello et al., 2006; Fox et al., 1984; Marie et al., 1982; Marti et al., 1988). Por su parte, los reportes de neoplasias hematológicas asociadas a la EF son mucho más escasos (Cybulla et al., 2006). Sin embargo, la literatura médica incluye algunos reportes de la coexistencia de EF con desórdenes autoinmunes (Arias Martínez et al., 2003; Martinez et al., 2007; Whybra et al., 2006)

Teniendo en consideración los antecedentes mencionados, el presente capítulo se dedica al estudio de las poblaciones leucocitarias presentes en la EF, analizando la posible acumulación de Gb<sub>3</sub>, y la existencia de anormalidades en la distribución de dichas poblaciones y algunos de sus marcadores de superficie.



## Análisis de subpoblaciones de leucocitos y expresión de marcadores de superficie en la Enfermedad de Fabry

### Análisis de subpoblaciones leucocitarias

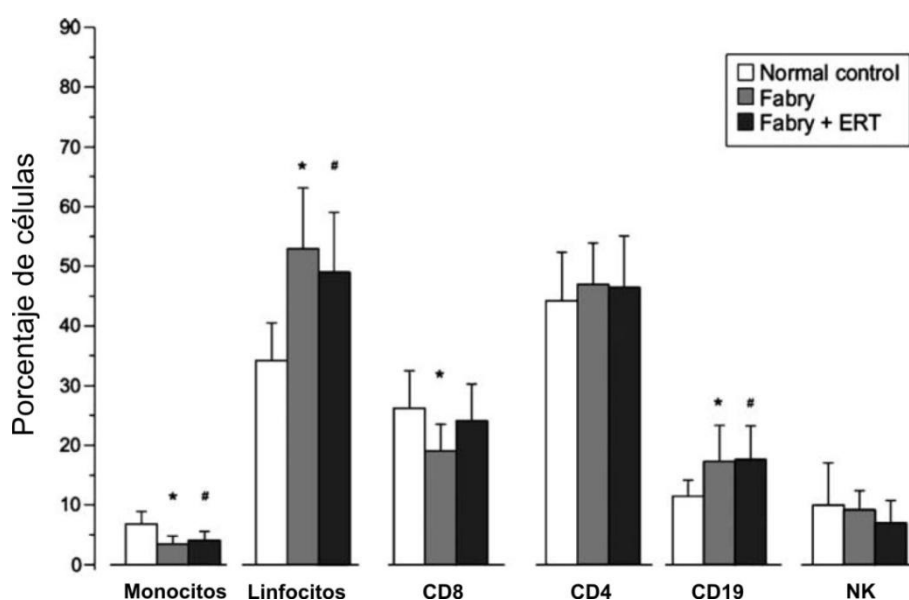
Para caracterizar las poblaciones leucocitarias y los niveles de expresión de diversos marcadores celulares, se realizó una marcación inmunofenotípica y posterior evaluación por citometría de flujo en sangre de pacientes con EF, con o sin tratamiento con ERT, y controles normales. Las muestras analizadas se incubaron con anticuerpos específicos para CD4, CD8, CD3, CD56/CD16, CD19, LIN-1, HLA-DR, CD11c, CD123, CD14, CD31, CD1d y TCR-V $\alpha$ 24, en superficie, y CD77 (Gb<sub>3</sub>) intracitoplasmático.

Los resultados obtenidos para los porcentajes de cada subpoblación leucocitaria en los tres grupos estudiados se presentan en la **Tabla 3**.

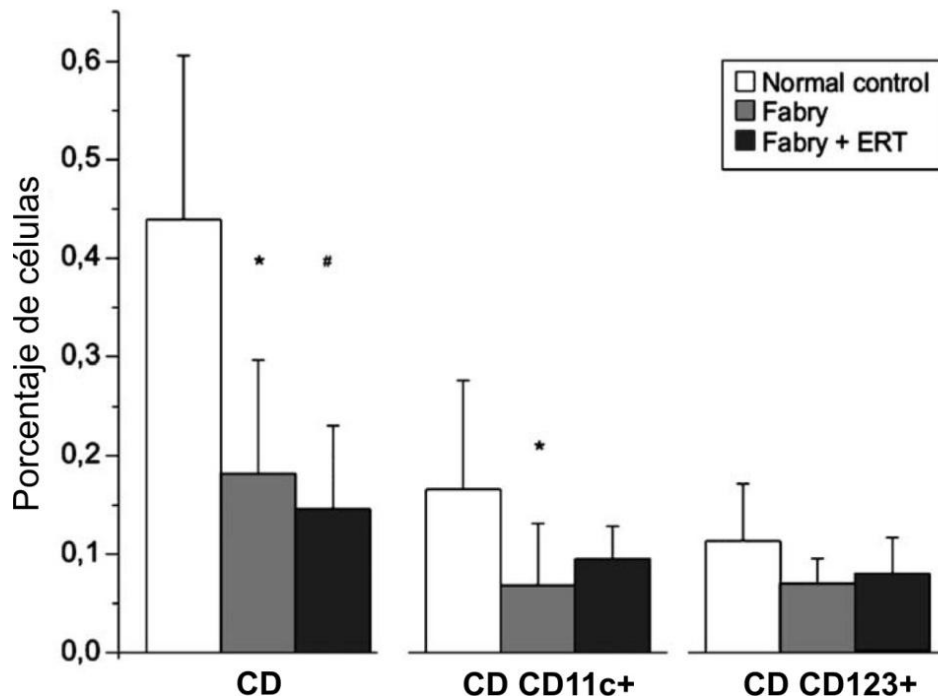
Al comparar con los controles normales, se observó una proporción más baja de monocitos en sangre de pacientes Fabry con ( $p=0,001$ ) o sin tratamiento ERT ( $p=0,02$ ), mientras que no hubo diferencias significativas en los porcentajes de granulocitos. Se observó también un porcentaje más elevado de linfocitos en ambos grupos de pacientes (con y sin ERT,  $p<0,001$ ). Dentro de la subpoblación de linfocitos, la proporción de linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> fue menor en pacientes sin tratar que en controles o pacientes con ERT ( $p=0,01$ ), mientras que el porcentaje de linfocitos B, identificados por CD19, fue mayor en ambos grupos de pacientes comparados con los controles normales ( $p<0,002$ ). No se observaron diferencias significativas en las células T CD4<sup>+</sup> o las células NK entre los grupos (**Figura 2**).

**Tabla 3:** Porcentaje de poblaciones leucocitarias de sangre periférica en pacientes Fabry (F) y pacientes Fabry en ERT (F+ERT), comparados con controles normales (N)

Subpoblación leucocitaria	Porcentaje de	Media $\pm$ SD			Valor p		
		N	F	F+ERT	N vs F	N vs F+ERT	F vs F+ERT
Granulocitos	Sangre periférica	55,01 $\pm$ 7,52	47,81 $\pm$ 6,26	44,3 $\pm$ 10,49	NS	NS	NS
Monocitos		6,88 $\pm$ 1,89	3,66 $\pm$ 1,32	4,44 $\pm$ 1,13	0,001	0,02	NS
Linfocitos		34,13 $\pm$ 6,36	52,9 $\pm$ 10,2	49,01 $\pm$ 10,07	0,0001	0,001	NS
CD3 <sup>+</sup>	gate Linfocitario	72,88 $\pm$ 10,22	69,61 $\pm$ 7,21	71,62 $\pm$ 6,59	NS	NS	NS
CD4 <sup>+</sup>		44,25 $\pm$ 8,04	46,98 $\pm$ 6,87	46,46 $\pm$ 8,58	NS	NS	NS
CD8 <sup>+</sup>		26,18 $\pm$ 6,27	19,01 $\pm$ 4,52	24,11 $\pm$ 6,13	0,01	NS	NS
CD3 <sup>+</sup> V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>		0,42 $\pm$ 0,31	0,48 $\pm$ 0,3	0,44 $\pm$ 0,37	NS	NS	NS
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>	gate CD3 <sup>+</sup> V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>	42,88 $\pm$ 23,69	61,01 $\pm$ 12,24	61,71 $\pm$ 8,28	NS	NS	NS
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>		30,53 $\pm$ 14,29	24,38 $\pm$ 10,05	20,3 $\pm$ 10,69	NS	NS	NS
CD19 <sup>+</sup>	gate Linfocitario	12,59 $\pm$ 3,83	16,6 $\pm$ 6,86	17,58 $\pm$ 5,65	0,004	0,002	NS
NK		11,39 $\pm$ 7,82	9,2 $\pm$ 3,15	6,95 $\pm$ 3,79	NS	NS	NS
HLA DR <sup>+</sup> /lin1 <sup>-</sup>		0,44 $\pm$ 0,17	0,17 $\pm$ 0,11	0,15 $\pm$ 0,08	0,007	0,0001	NS
DC CD11c <sup>+</sup>		0,17 $\pm$ 0,11	0,07 $\pm$ 0,06	0,08 $\pm$ 0,04	0,02	NS	NS
DC CD123 <sup>+</sup>		0,11 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,03	NS	NS	NS



**Figura 2:** Porcentajes de subpoblaciones leucocitarias en sangre periférica de pacientes con EF (barras grises), pacientes con EF bajo ERT (barras negras), y controles normales (barras blancas). Se marcaron con asteriscos (\*) o con numerales (#) las diferencias estadísticamente significativas entre pacientes o pacientes bajo ERT y controles normales, respectivamente.



**Figura 3:** Porcentaje de células dendríticas en sangre periférica de pacientes con EF (barras grises), pacientes con EF en ERT (barras negras) o controles normales (barras blancas). Se marcaron con asteriscos (\*) o con numerales (#) las diferencias estadísticamente significativas entre pacientes o pacientes bajo ERT y controles normales, respectivamente.

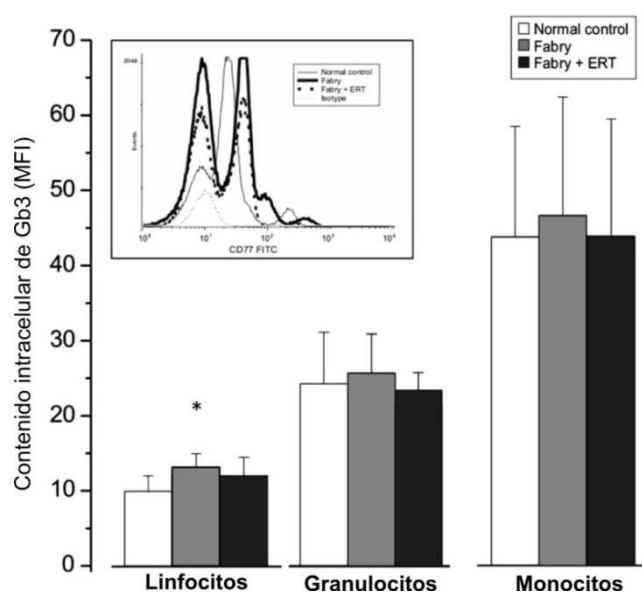
El número total de células NKT ( $CD3^+ V\alpha 24^+$ ) no difirió significativamente entre los grupos. Sin embargo se observó una proporción mayor de células  $CD4^+ CD3^+ V\alpha 24^+$  y una menor proporción de células  $CD8^+ CD3^+ V\alpha 24^+$  en los pacientes Fabry, aunque no alcanzó significancia estadística para ninguna de las dos poblaciones.

Para la subpoblación de células dendríticas (CD), identificadas como  $HLA-DR^+ / Lin-1^-$  se observó que su frecuencia total en sangre periférica de pacientes con EF era significativamente más bajas que en los controles normales ( $p < 0,007$ ). Al considerar las dos subpoblaciones de DC, el número de DC mieloides ( $CD11c^+$ ) fue significativamente menor en pacientes sin ERT que en controles y pacientes en ERT, pero no se observaron diferencias significativas para la subpoblación de DC plasmacitoides ( $CD123^+$ ) (**Figura 3**).

### Expresión de Gb<sub>3</sub> y marcadores de superficie

La acumulación intracelular de Gb<sub>3</sub> se analizó mediante su tinción intracelular con un anticuerpo monoclonal específico para este glicolípido (anti-CD77). Se observó una intensidad media de fluorescencia significativamente elevada en linfocitos ( $p=0,01$ ) de pacientes con enfermedad de Fabry sin tratamiento previo comparados con los controles normales (**Figura 4**). Sin embargo, los monocitos y granulocitos de los pacientes con enfermedad de Fabry no mostraron diferencias significativas. Se observó una tendencia hacia una reducción del contenido intracelular Gb<sub>3</sub>, evaluado por la MFI, en los pacientes con Fabry en ERT, pero la diferencia no fue significativa.

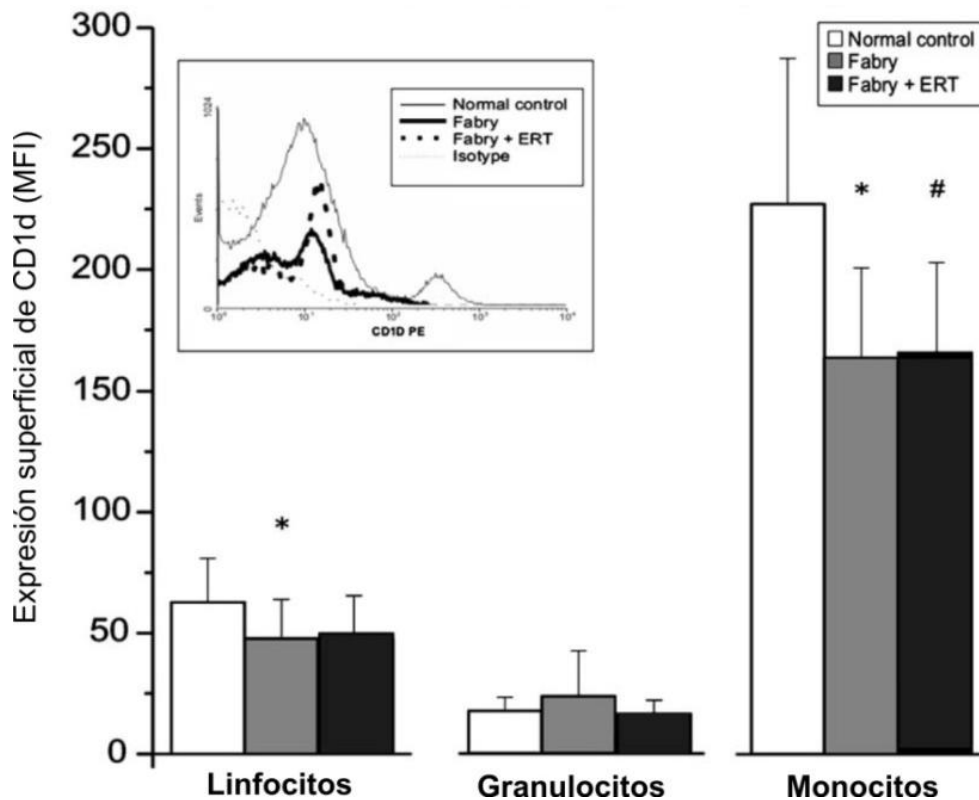
Se analizó la expresión superficial de dos moléculas presentadoras de antígeno, MHC clase II y CD1d. La expresión de CD1d fue significativamente menor en los linfocitos ( $p = 0,01$ ) y monocitos ( $p=0,005$ ) de los pacientes con Fabry (**Figura 5**).



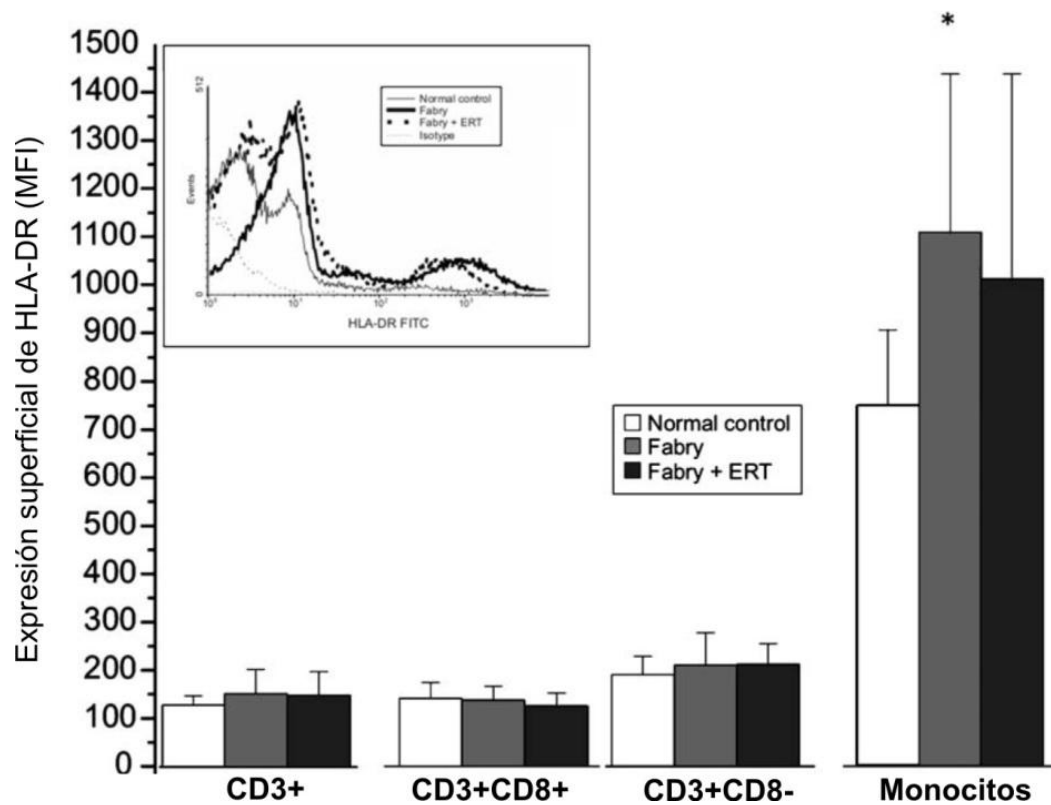
**Figura 4:** Contenido intracelular de Gb<sub>3</sub> en leucocitos de pacientes con enfermedad de Fabry (barras grises), pacientes con enfermedad de Fabry en ERT (barras negras) y controles normales (barras blancas). En el recuadro se muestran histogramas representativos de una muestra de los controles normales (línea de puntos), de los pacientes Fabry (línea gruesa), de los pacientes Fabry en ERT (línea de puntos gruesa) y el control de isotipo (línea discontinua). Se marca con un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre pacientes Fabry y controles normales



La expresión de MHC de clase II fue analizada en células  $CD3^+$  y en el *gate* de monocitos. El porcentaje de células  $CD3^+$  ( $p = 0,02$ ),  $CD8^+ CD3^+$  ( $p = 0,02$ ) y  $CD8^- CD3^+$  ( $p = 0,01$ ) en las células que expresaban MHC de clase II fue menor en los pacientes con enfermedad de Fabry que en los controles normales (datos no graficados). Sin embargo, la expresión de superficie, evaluada por MFI, no difirió entre los pacientes y controles. Por el contrario, el porcentaje de células positivas para MHC de clase II en el *gate* de monocitos no mostró diferencias significativas, pero la expresión superficial fue significativamente mayor ( $p = 0,02$ ) en pacientes Fabry sin tratamiento previo que en controles normales (**Figura 6**).

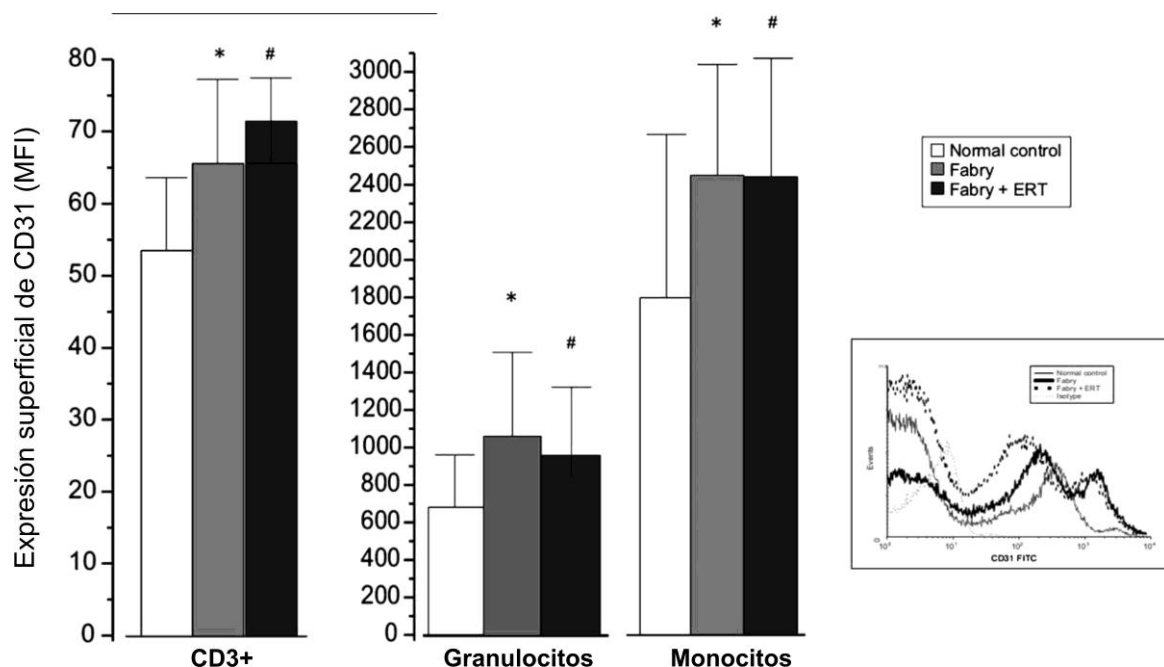


**Figura 5:** Expresión de CD1d en la superficie de leucocitos de pacientes con enfermedad de Fabry (barras grises), pacientes con enfermedad de Fabry en ERT (barras negras) y controles normales (barras blancas). En el recuadro se muestran histogramas representativos de una muestra de los controles normales (línea de puntos), de los pacientes Fabry (línea gruesa), de los pacientes Fabry en ERT (línea de puntos gruesa) y el control de isotipo (línea discontinua). Se marca con un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre pacientes Fabry y controles normales



**Figura 6:** Expresión de MHC clase II en la superficie de leucocitos de pacientes con enfermedad de Fabry (barras grises), pacientes con enfermedad de Fabry en ERT (barras negras) y controles normales (barras blancas). En el recuadro se muestran histogramas representativos de una muestra de los controles normales (línea de puntos), de los pacientes Fabry (línea gruesa), de los pacientes Fabry en ERT (línea de puntos gruesa) y el control de isotipo (línea discontinua). Se marca con un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre pacientes Fabry y controles normales

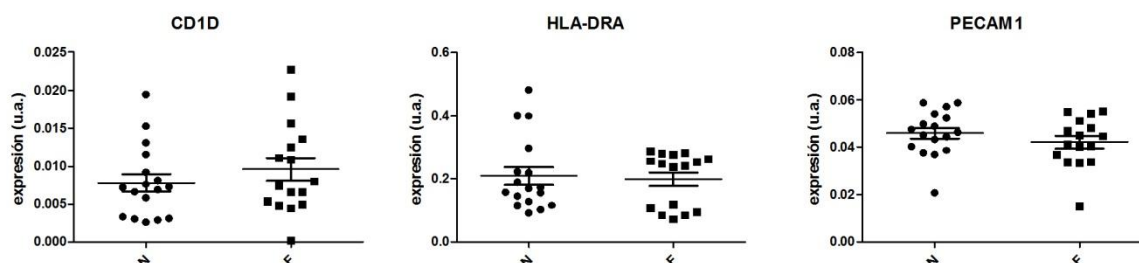
También se determinó la expresión de las moléculas de adhesión CD31 y CD38 en la superficie de leucocitos. La expresión de superficie de CD31 en los linfocitos CD3<sup>+</sup>, monocitos y granulocitos, evaluado por MFI, fue significativamente mayor ( $p < 0,04$ ) en ambos grupos de pacientes con enfermedad de Fabry que en los controles normales (**Figura 7**), pero no se observaron diferencias en el análisis del marcador CD38 (no mostrado).



**Figura 7:** Expresión de CD31 en la superficie leucocitos de pacientes con enfermedad de Fabry (barras grises), pacientes con enfermedad de Fabry en ERT (barras negras) y controles normales (barras blancas). En el recuadro se muestran histogramas representativos de una muestra de los controles normales (línea de puntos), de los pacientes Fabry (línea gruesa), de los pacientes Fabry en ERT (línea de puntos gruesa) y el control de isotipo (línea discontinua). Se marca con un asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas entre pacientes Fabry y controles normales

## Expresión génica de marcadores de superficie en PBMC de pacientes con Enfermedad de Fabry

Teniendo en cuenta los resultados previamente obtenidos sobre la expresión superficial alterada de CD1d, MHC clase II y CD31 en diferentes subpoblaciones de PBMC en pacientes, decidimos indagar si estos cambios podían evidenciarse a nivel de expresión génica. Para ello realizamos una medida de expresión para los genes CD1D, PECAM1 y HLA-DRA (correspondientes a CD1d, CD31 y unas de las moléculas constituyentes del MHC clase II, la cadena  $\alpha$  del HLA-DR, respectivamente) mediante RT-qPCR sobre PBMC, tanto para pacientes como para controles normales.



**Figura 8:** Expresión génica de CD1D, HLA-DRA y PECAM1 en PBMC de pacientes Fabry (F) y controles normales (N)

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre pacientes y controles para ninguno de los tres genes medidos (**Figura 8**). Esto indicaría que las diferencias observadas por citometría de flujo para estas moléculas de superficie no se deben a una alteración en la expresión génica, sino a algún proceso posterior.

### Características ultraestructurales de las PBMC en la Enfermedad de Fabry mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

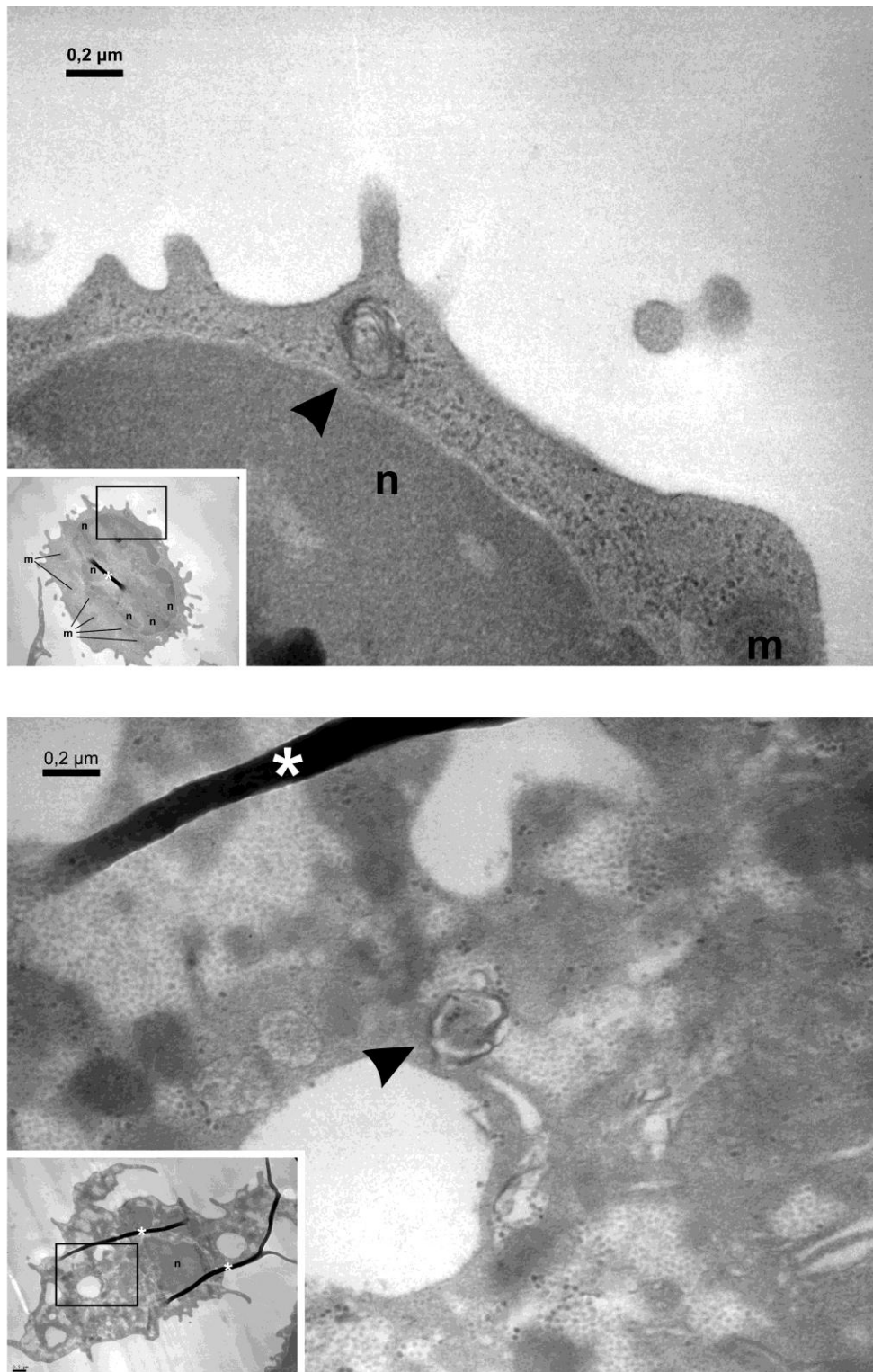
Con el fin de profundizar la caracterización de las PBMC en la enfermedad de Fabry, se realizaron estudios ultraestructurales por microscopía electrónica de transmisión (MET) de células de pacientes con EF, contrastándolas con las de controles normales.

Para ello, se obtuvieron PBMC por separación en gradiente de ficoll de sangre periférica, se fijaron con glutaraldehído y se remitieron para su posterior procesamiento, montaje, corte y observación.

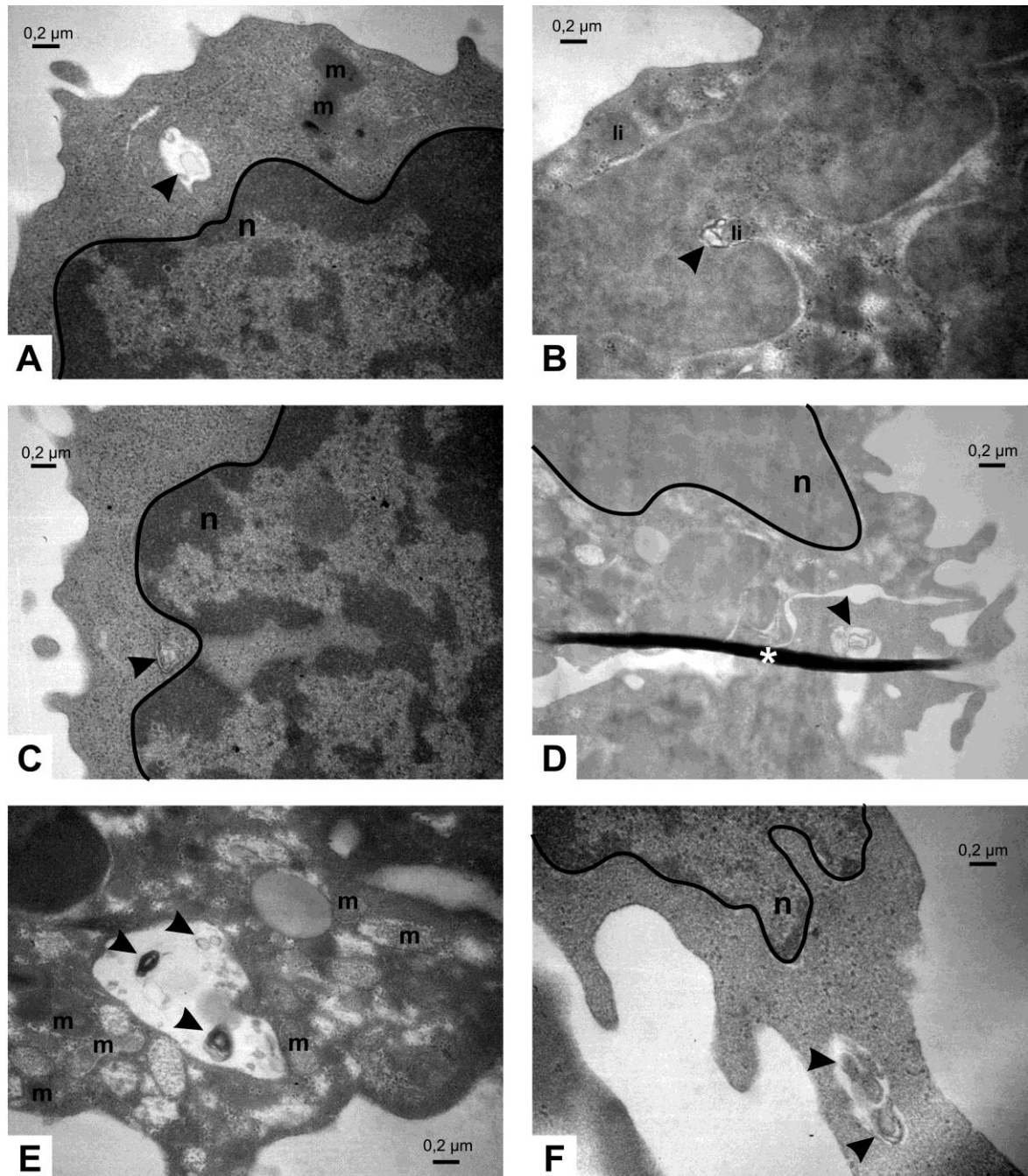
La observación de la ultraestructura de los PBMC provenientes de pacientes con EF nos permitió identificar la presencia de inclusiones con una disposición de capas concéntricas electrondensas, compatibles con la presencia de cuerpos lamelares. Estas estructuras están formadas por el acúmulo de glicolípidos no procesados, y constituyen una característica

distintiva de varios tejidos clásicamente afectados en la Enfermedad de Fabry (Desnick et al., 2000; Askari et al., 2007; Chévrier et al., 2010; Rozenfeld et al., 2006). Estas inclusiones pudieron ser observadas tanto en células con morfología de linfocitos como de monocitos/macrófagos (**Figura 9** y **Figura 10**).

Si bien estas inclusiones lamelares no fueron muy abundantes, su presencia no pudo ser observada en las muestras provenientes de controles normales, constituyendo una característica diferencial. La presencia esporádica de estas inclusiones estaría en concordancia con las observaciones de niveles ligeramente elevados de Gb3 en linfocitos de pacientes Fabry.



**Figura 9:** Inclusiones lamelares (flechas) observadas mediante microscopía electrónica de transmisión en un linfocito (panel superior) y un monocito/macrófago (panel inferior) provenientes de un paciente con EF. Los recuadros pequeños muestran un campo más amplio de la zona observada. Claves: n: núcleo, m: mitocondria, asterisco: artefacto debido a un pliegue en el corte ultrafino.



**Figura 10:** Inclusiones lamelares (flechas) observadas mediante microscopía electrónica de transmisión en diferentes células provenientes de PBMC de pacientes con EF. A) linfocito; B) monocito; C) linfocito; D) monocito (sup.) y linfocito (inf.) en contacto; E) monocito/macrófago, con estructuras compatibles con una vacuola autofágica; F) monocito. Claves: n: núcleo, m: mitocondria, li: lisosoma, asterisco: artefactos debidos al pliegues en el corte ultrafino.





## Apoptosis en PMBC en la Enfermedad de Fabry

### Introducción

La inflamación y la apoptosis han sido estudiadas extensamente en modelos murinos de diferentes EL, y parecen ser un hallazgo común. Estudios en modelos animales de EL han demostrado apoptosis aumentada en condrocitos en mucopolisacaridosis (MPS) VI (Simonaro et al., 2001), una reducción en la expresión del represor de apoptosis Bcl-2 en cerebros de un modelo murino de enfermedad de Gaucher (Hong et al., 2004) y un aumento en la tasa de muerte celular en cerebro para el modelo murino de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (Wu et al., 2005). Además, las células de pacientes con EL diferentes son más susceptibles a entrar en apoptosis (Wei et al., 2008).

La apoptosis es un proceso natural por el cual las células sufren muerte celular para controlar el número de células y la proliferación, y forma parte normal del desarrollo. Una desregulación en apoptosis puede romper el delicado balance que existe entre proliferación y apoptosis.

Existen tres vías de muerte celular por apoptosis: la vía extrínseca, que señala a través de receptores de muerte asociados a la membrana plasmática (Green y Kroemer, 2004), la vía intrínseca, que involucra a las mitocondrias (Nagata, 1997), y la vía de estrés del retículo

endoplásmico (RE), que se activa ante una sobrecarga continua de proteínas mal plegadas en el RE (Boyce y Yuan, 2006). Estas vías están caracterizadas por el reclutamiento específico de distintas caspasas iniciadoras: la caspasa 8, la caspasa 9 y la caspasa 4/12, respectivamente. Todas estas vías convergen finalmente en la activación de la caspasa 3, una caspasa efectora común a las tres rutas, la cual cliva proteínas regulatorias y estructurales, desencadenando eventos que conducen a la muerte celular (Thornberry y Lazebnik, 1998)

La vía extrínseca se inicia por la activación de los receptores CD95 (Fas, APO-1), receptor 1 de TNF, receptores TRAIL 1 y 2, que producen el reclutamiento de la proteína adaptadora FADD y luego caspasa 8, que activa a la caspasa 3 (Elmore, 2007). La vía intrínseca se caracteriza por una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo c desde la mitocondria hacia el citoplasma, donde interactúa con Apaf-1, que recluta a caspasa 9, la cual finalmente activa la caspasa 3 (Budihardjo et al., 1999). Ambas vías convergen a una ruta final común que lleva al clivaje de proteínas regulatorias y estructurales que culmina en la muerte celular (Thornberry y Lazebnik, 1998). Además de las dos vías clásicas de muerte celular programada, el tercer mecanismo que conduce a apoptosis viene dado por la acumulación de proteínas mutantes con defectos de plegamiento (Carrell y Lomas, 1997), que generan estrés en el RE y activan un mecanismo conocido como respuesta por proteínas desplegadas (UPR, *unfolded protein response*) (Mori, 2000; Shen et al., 2004). En aquellos casos donde existe un nivel sostenido de estrés en el RE se genera muerte celular programada a través de distintos mediadores: activación de caspasa 12, aumento de síntesis de CHOP mediante la vía de activación de PERK, la fosforilación de eIF2a y activación por IER1 de la JNK (Nakagawa et al., 2000; Urano et al., 2000; Zinszner et al., 1998).

Los procesos asociados al estrés del RE tienen relevancia en el contexto de las enfermedades lisosomales, ya que mutaciones en las proteínas lisosomales pueden conducir al mal plegamiento de la proteína, lo que generaría una alteración en el tráfico normal de la proteína al lisosoma. De hecho, el estrés de retículo es un hallazgo común en varias EL (Vitner et al., 2010).

El plegado de proteínas en el lumen del RE es asistido o facilitado por un número de chaperonas moleculares, que incluyen BiP/GRP78 (codificada por el gen HSPA5) y GRP94 (gen HSP90B1), así como enzimas de plegado como la proteína disulfuro isomerasa (DPI) y la

peptidil-prolil cis-trans isomerasa. En respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, las células eucariotas activan una vía de señalización intracelular desde el RE al núcleo, la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), que resulta en la regulación transcripcional positiva de estas proteínas residentes en el RE (Shen et al., 2004).

Dado que los genes diana del UPR codifican para la mayoría de las chaperonas y enzimas involucradas en el plegamiento en el RE, así como numerosas proteínas que actúan en diversas etapas de secreción, el UPR tiene un propósito doble: aumentar la capacidad de plegamiento de las proteínas sintetizadas en el RE y remodelar específicamente las vías secretoras para minimizar la cantidad y/o concentración de las proteínas mal plegadas en el RE (Mori, 2000).

Otro elemento de relevancia en el contexto de la apoptosis en las enfermedades lisosomales es el estrés oxidativo. Existe evidencia creciente que sugiere que las especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) podrían participar como inductoras de la apoptosis en varias EL (Vitner et al., 2010; Wei et al., 2008).

El estrés oxidativo, causado por el desequilibrio entre las ROS y los sistemas anti-oxidantes de la célula, puede conducir a la modificación de macromoléculas tales como ADN, lípidos, y proteínas. Debido a que el estado redox de las células está implicado en la regulación de diversos factores de transcripción importantes para la expresión de genes y la modulación de vías de señalización, la existencia de niveles apropiados de ROS es necesaria para el funcionamiento fisiológico normal. Sin embargo, el exceso de ROS puede provocar daños en el ADN, reprimir la actividad de las enzimas celulares, e inducir la muerte celular a través de la activación de quinasas y cascadas de caspasas.

Existen varios sistemas celulares encargados de mantener la homeostasis de ROS e impedir una sobrecarga que conduzca a estrés oxidativo. Entre ellos, las superóxido dismutasas (SOD) cumplen un rol central. Existen tres isoformas de estas proteínas: la citoplasmática (Cu/Zn-SOD, o SOD1), la mitocondrial (Mn-SOD, o SOD2) y una tercera forma extracelular (SOD3). De estas tres, las dos primeras son las más importantes, siendo la SOD2 una isoforma fácilmente inducible ante una sobrecarga transitoria de ROS (Miao y St Clair, 2009).

En el presente capítulo, evaluaremos como hipótesis la existencia de una alteración en la homeostasis inmunológica en la EF, posiblemente asociada a un estado proinflamatorio, que conduciría a una mayor tasa de muerte celular por apoptosis. Para ello, estudiaremos el estado apoptótico de PBMC de pacientes con EF mediante diferentes marcadores, y analizaremos la relevancia que tienen para este proceso los niveles elevados de Gb<sub>3</sub> hallados en la enfermedad.

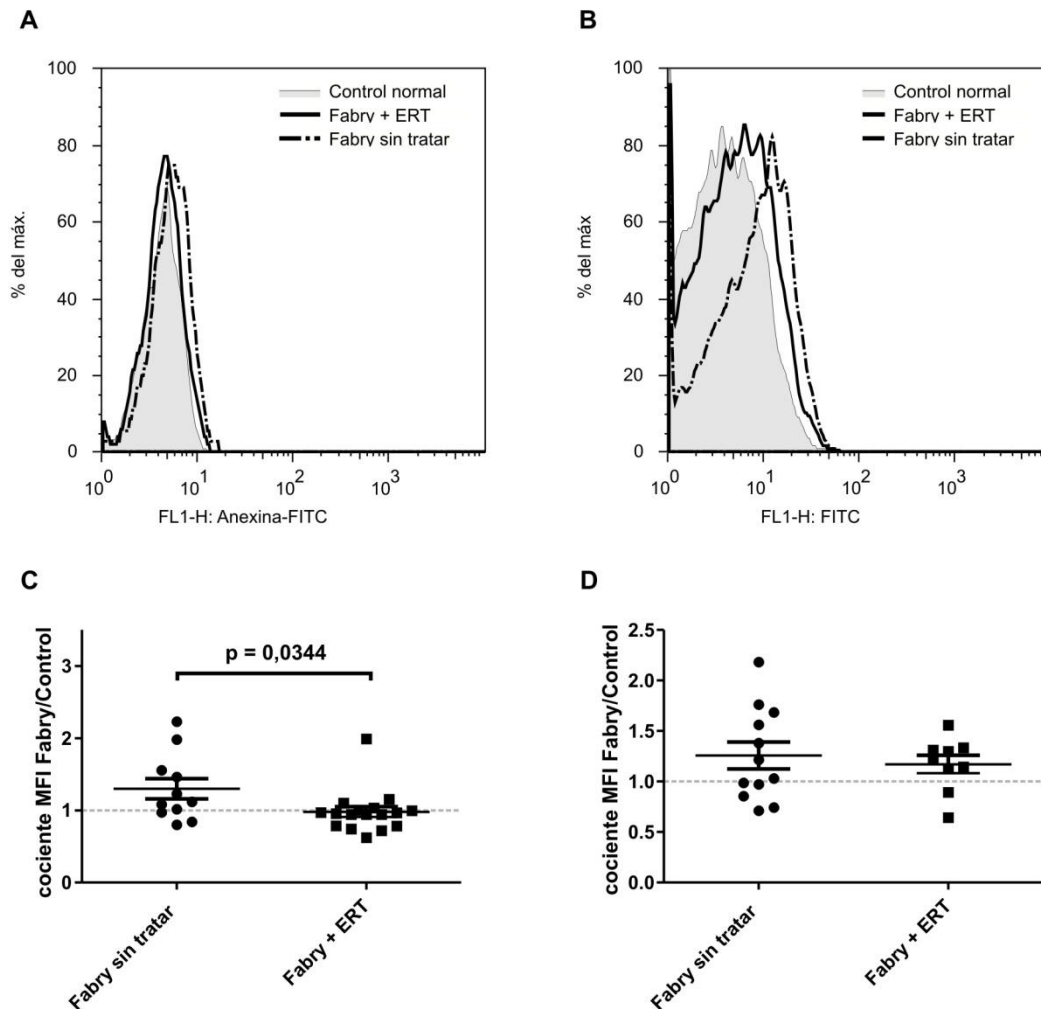
## Marcadores de apoptosis en PBMC en la Enfermedad de Fabry

Se estudió el estado apoptótico en PBMC de pacientes con EF, tanto tratados con ERT como sin tratar, mediante los ensayos por citometría de flujo de Anexina V y TUNEL, para evaluar los eventos apoptóticos tempranos y tardíos, respectivamente.

Los histogramas obtenidos para Anexina V y TUNEL mostraron niveles de fluorescencia mayores para los pacientes Fabry sin tratar comparados con pacientes tratados o controles normales (**figura 11**, panel superior). Se calcularon los cocientes de las intensidades medias de fluorescencia (MFI) obtenidos por Anexina V y TUNEL para pacientes tratados y sin tratar, respecto de las MFI obtenidas para controles normales procesados en paralelo. De esta manera, se observó que una proporción considerable de los pacientes Fabry sin tratar presentaban cocientes mayores que la unidad, lo que es indicador de un estado apoptótico más elevado en las PBMC de estos pacientes comparados con los controles. Más aún, los pacientes Fabry que estaban sujetos a ERT presentaron cocientes de MFI menores que los observados para pacientes sin tratar, especialmente en el ensayo de Anexina V ( $p=0,034$ ), lo que pone de manifiesto una diferencia significativa entre ambos grupos de pacientes (**figura 11**, panel inferior).

## Vías apoptóticas activas en PBMC en la Enfermedad de Fabry

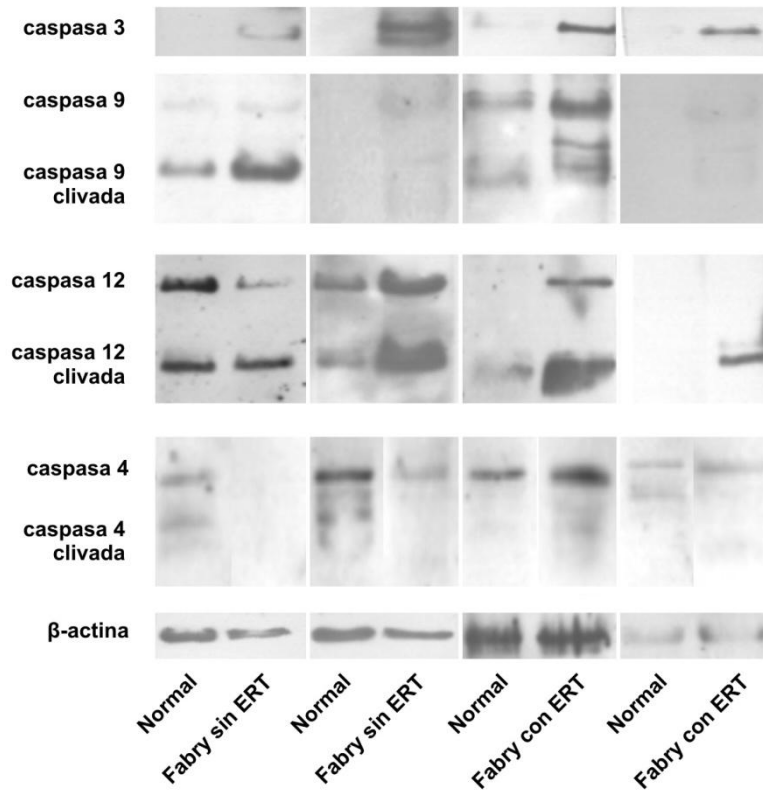
Con el fin de investigar si la apoptosis observada en PBMC de pacientes es mediada, al menos parcialmente, por caspasas, se realizaron ensayos de *immunoblotting* en lisados de



**Figura 11:** Determinación de apoptosis por análisis de Anexina V y TUNEL mediante citometría de flujo en PBMC de pacientes Fabry sin tratar y con ERT, comparados con controles normales. Se muestran histogramas (panel superior) y los cocientes entre los valores de MFI de pacientes y controles normales (panel inferior), obtenidos por Anexina V (A y C) y TUNEL (B y D).

PBMC de pacientes Fabry y controles normales, analizando, en primer término, los niveles de caspasa 3, ya que cumple el rol de efector final común de las vías apoptóticas de caspasas.

Las muestras de pacientes mostraron un nivel más elevado de caspasa 3, comparados con los controles normales (**figura 12**). No se logró determinar la presencia de la forma activa de la caspasa 3 en ninguna de las muestras, debido probablemente a que las concentraciones de este polipéptido se encuentran por debajo del nivel de sensibilidad del ensayo utilizado.



**Figura 12:** Immunoblotting de las caspasas 3, 9, 12 y 4 en PBMC de pacientes Fabry tratados con ERT y sin tratar, y controles normales. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga.

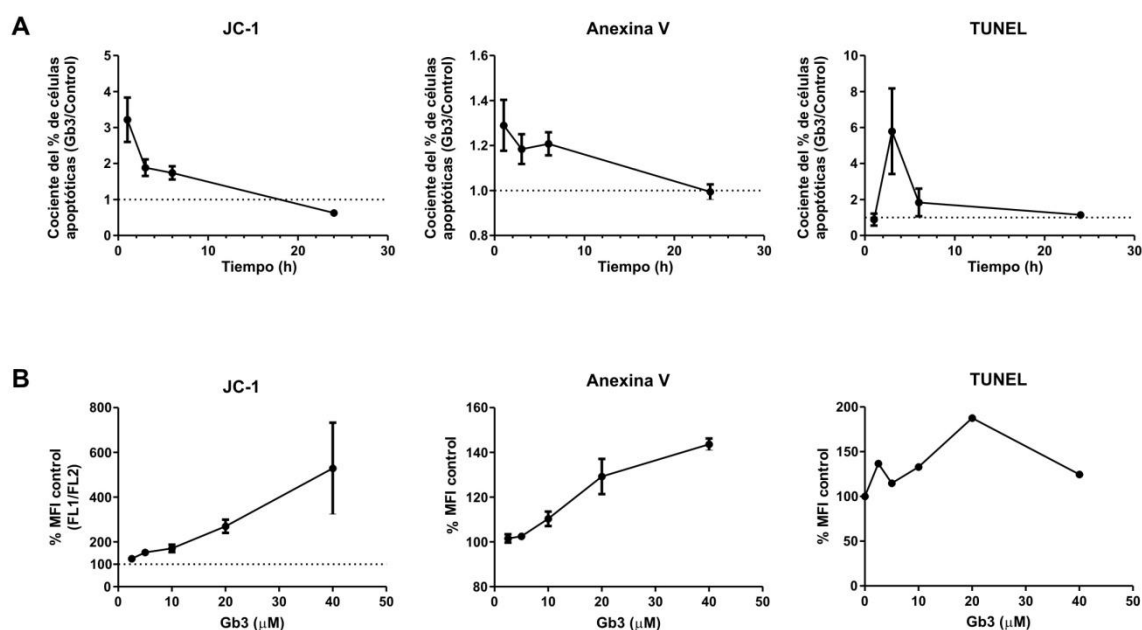
Para investigar cuál es la vía apoptótica que se encuentra activada en la enfermedad de Fabry, analizamos a continuación los niveles de cada una de las caspasas específicas iniciadoras de las tres diferentes vías: caspasa 8 (vía extrínseca), caspasa 9 (vía intrínseca) y caspasas 12 y 4 (vías asociadas a estrés del retículo endoplásmico).

Los niveles de caspasa 8 no fueron detectables en ninguna de las muestras. Por su parte, los niveles de caspasas 9 y 12, tanto en sus formas completas como en sus productos activos clivados, fueron más elevados en las muestras provenientes de pacientes Fabry que en las de controles normales. Los niveles de caspasa 4 fueron variables al comparar pacientes y controles. No se evidenciaron diferencias en los niveles de ninguna de las caspasas estudiadas entre pacientes tratados con ERT y sin tratar.

## Tratamiento in vitro de PBMC con Gb<sub>3</sub>

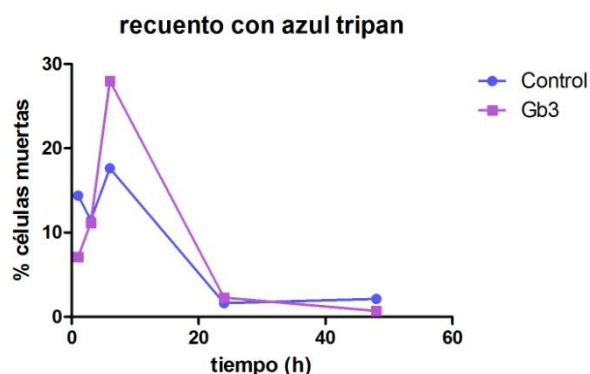
Habiendo detectado un mayor nivel de apoptosis en células de pacientes Fabry, decidimos analizar si el aumento en la exposición al Gb<sub>3</sub> era la causa de la mayor muerte celular. El Gb<sub>3</sub> es el principal sustrato de la  $\alpha$ -galactosidasa A, y sus concentraciones plasmáticas están frecuentemente elevadas en los pacientes con Enfermedad de Fabry (Togawa et al., 2010). Para estos experimentos tratamos PBMC normales con Gb<sub>3</sub> 20  $\mu$ M, una concentración comparable con la hallada en el plasma de pacientes Fabry hemigotas, por diferentes tiempos.

El análisis de apoptosis mediante Anexina V reveló niveles apoptóticos aumentados en las células tratadas con Gb<sub>3</sub> respecto de las células control, de 1 a 6 hs (**figura 13, A**). El ensayo



**Figura 13:** Determinación mediante citometría de flujo de la despolarización de la membrana mitocondrial por JC-1, y de apoptosis por Anexina V y TUNEL en PBMC de controles normales tratados con Gb<sub>3</sub>. En el panel A se muestran las cinéticas de estos tres parámetros durante el tratamiento con Gb<sub>3</sub> 20  $\mu$ M. En el panel B se representan las respuestas dosis-dependientes ante el agregado de Gb<sub>3</sub> medidas por JC-1 a 1h, Anexina V a 1h y TUNEL a las 3h. Los datos se expresan como cociente entre células tratadas y controles.





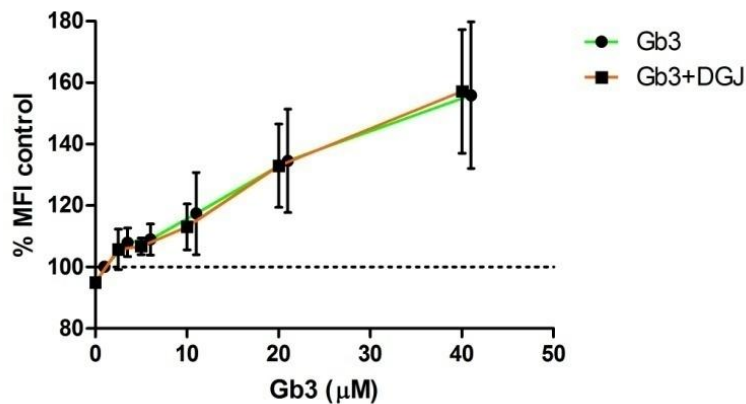
**Figura 14:** Recuento de células muertas realizados a distintos tiempos en cultivos tratados con Gb<sub>3</sub> 20  $\mu$ M o control, mediante la tinción vital de azul tripan. Los resultados se expresan como porcentaje de células muertas respecto del recuento total.

de TUNEL mostró un máximo de apoptosis alrededor de las 3 hs post tratamiento con Gb<sub>3</sub>. Cuando se realizaron recuentos utilizando azul tripan como tinción vital, se observó un mayor número de células muertas en las PBMC tratadas con Gb<sub>3</sub> (**Figura 14**).

Para verificar si la apoptosis inducida por Gb<sub>3</sub> era mediada por la vía intrínseca, también se analizaron los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ m) mediante la sonda JC-1 por citometría de flujo. Los aumentos observados en el porcentaje de células positivas y en la media geométrica del cociente entre las fluorescencias verde/roja indicaron una inducción en la despolarización de la membrana mitocondrial ante el agregado de Gb<sub>3</sub>. Estos resultados son compatibles con la activación de la vía intrínseca de apoptosis.

Para validar estos hallazgos, realizamos un análisis de dosis-respuesta sobre PBMC normales, cultivándolas con dosis crecientes de Gb<sub>3</sub>, en un rango de 2,5 a 40  $\mu$ M. Tanto los análisis de apoptosis por Anexina V a 1h o por TUNEL a 3h, como la pérdida del  $\Delta\Psi$ M medida por JC-1 mostraron una fuerte correlación positiva con la dosis de Gb<sub>3</sub>, confirmando el efecto apoptótico de niveles patológicamente elevados de Gb<sub>3</sub> sobre PBMC normales (**Figura 13, B**).

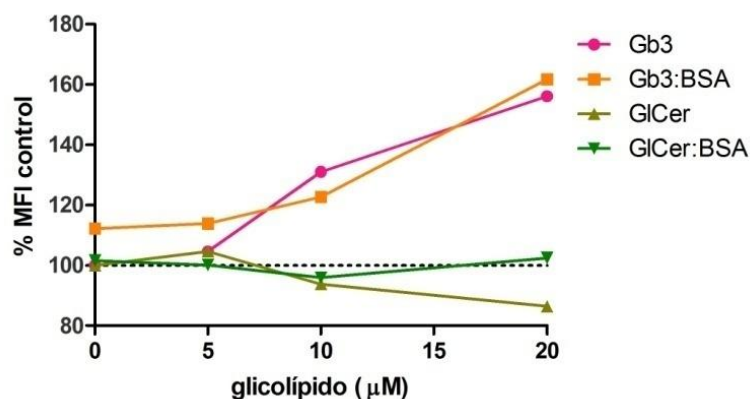
Cuando estos mismos ensayos se realizaron sobre PBMC normales que habían sido previamente incubadas con DGJ a concentraciones inhibitorias para la  $\alpha$ -galactosidasa A, las respuestas observadas no se vieron alteradas, indicando que el Gb<sub>3</sub> produce apoptosis en estas



**Figura 15:** Determinación mediante citometría de flujo del nivel de apoptosis por la técnica de Anexina V en células mononucleares normales cultivadas con diferentes concentraciones de Gb<sub>3</sub>, sin tratamiento previo (Gb<sub>3</sub>) o tratados previamente con DGJ 200 μM (Gb<sub>3</sub>+DGJ). Los resultados mostrados corresponden al promedio de dos experimentos independientes, y se expresan referidos al valor de MFI del control (0 μM Gb<sub>3</sub>). Las barras de error (SEM) han sido desplazadas ligeramente en el sentido horizontal para que puedan distinguirse las dos series.

condiciones independientemente del nivel de actividad de α-galactosidasa A presente en las células (**Figura 15**).

Dada la naturaleza anfipática del Gb<sub>3</sub>, su presencia en el plasma se encuentra distribuida entre las diferentes fracciones lipoproteicas circulantes. Las proporciones en las que el Gb<sub>3</sub> se distribuye entre las diferentes fracciones lipoproteicas no difieren entre pacientes con EF e individuos sanos, si bien la concentración plasmática total de Gb<sub>3</sub> es más elevada en los pacientes. (Clarke, 1981; Clarke et al., 1976; Vance et al., 1969). Las formas mayoritarias en las que puede hallarse el Gb<sub>3</sub> en el plasma son formando parte del LDL y del HDL, y en menor proporción complejoado con albúmina sérica (lo que en la literatura se suele designar como residuo de ultracentrifugación). Sin embargo, se ha demostrado que el Gb<sub>3</sub> ligado a LDL y HDL no se intercambia fácilmente con otras fracciones lipoproteicas en plasma (a diferencia de lo que ocurre con otros lípidos, como el colesterol o los triglicéridos), conformando así un pool endógeno fuertemente asociado a estas lipoproteínas (Clarke y Stoltz, 1976), por lo que sería razonable pensar que la fracción ligada a albúmina es la que con mayor facilidad podría participar en intercambios e interacciones con los leucocitos en circulación.



**Figura 16:** Determinación de apoptosis mediante citometría de flujo por Anexina V en un experimento de cultivo de PBMC normales con el agregado de cantidades crecientes de Gb<sub>3</sub>, Gb<sub>3</sub> complejoado equimolarmente con BSA (Gb<sub>3</sub>:BSA), GlCer, o GlCer complejoado equimolarmente con BSA (GlCer:BSA). Los resultados se expresan como porcentaje respecto del valor de MFI del control correspondiente.

Para probar si la manera de vehiculizar el agregado de Gb<sub>3</sub> en los experimentos modificaba su efecto, también se realizaron ensayos con Gb<sub>3</sub> formando un complejo con albúmina sérica bovina (BSA) en relación molar 1:1. Se comprobó que este tratamiento previo no alteraba los efectos apoptóticos sobre PBMC previamente observados (**Figura 16**). Es importante notar que aunque no se hubiera agregado como complejo el Gb<sub>3</sub> para realizar los experimentos, el medio de cultivo utilizado, AIM-V, contiene cantidades considerables de albúmina en su formulación, lo que junto con la relativamente baja cantidad de Gb<sub>3</sub> agregada, podría llevar a una rápida distribución del Gb<sub>3</sub> entre sus formas libres (monomérica o multimérica) y unidas a albúmina.

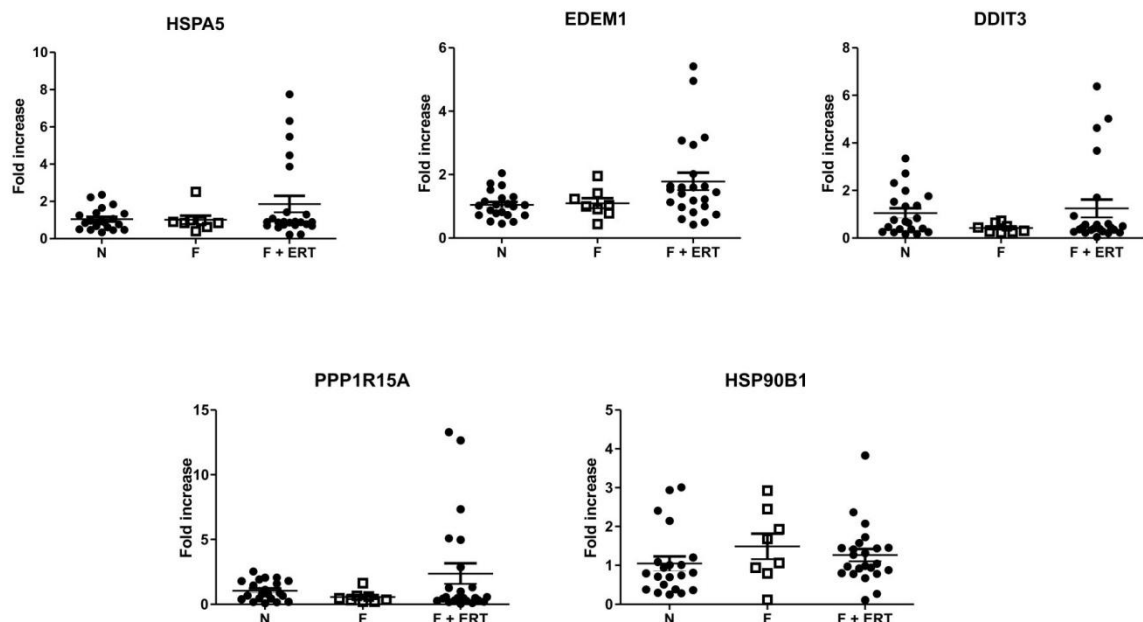
Se realizaron también, en paralelo con los experimentos arriba citados, ensayos de apoptosis en los cuales se reemplazó el Gb<sub>3</sub> con glucosilceramida (GlCer, Galβ1→4Glcβ→Cer), un lípido neutro de la misma familia estructural, con el fin de indagar la especificidad del efecto observado con Gb<sub>3</sub>. En estos experimentos con glucosilceramida los efectos apoptóticos desaparecieron, mostrando que los fenómenos antes observados son específicos del Gb<sub>3</sub> (**Figura 16**).

En conclusión, los hallazgos descriptos muestran un efecto directo de dosis patológicamente elevadas de Gb<sub>3</sub> sobre la fisiología de las células mononucleares, que podría

sugerir una relación causal con la apoptosis observada en pacientes. La observación de la disrupción del potencial mitocondrial mediante JC-1 indicaría la activación de la vía intrínseca de apoptosis como mediadora de este proceso.

## Marcadores de estrés de retículo endoplásmico en PBMC en la Enfermedad de Fabry

Al estudiar los niveles de las diferentes caspasas implicadas en los mecanismos de apoptosis en PBMC en la EF, se pudo determinar que los niveles de caspasa 12 se hallaban elevados, y los de caspasa 4 eran variables, en pacientes respecto de controles. Estas dos caspasas, como se nombró anteriormente, se encuentran involucradas en la vía de apoptosis asociada al estrés del RE. Por otra parte, se ha sugerido en la literatura que el estrés de RE es una característica común a varias EL (Wei et al., 2008). En consecuencia, decidimos estudiar si el aumento de apoptosis observado en PBMC en la EF podría estar asociado a estrés en el RE.



**Figura 17:** Análisis de expresión de genes relacionados al estrés de RE por RT-qPCR en PBMC de pacientes Fabry sin ERT (F), pacientes bajo ERT ( $F_{ERT}$ ) y controles normales (N). Los valores están mostrados como aumento de expresión (fold increase) respecto de la media de los controles normales.

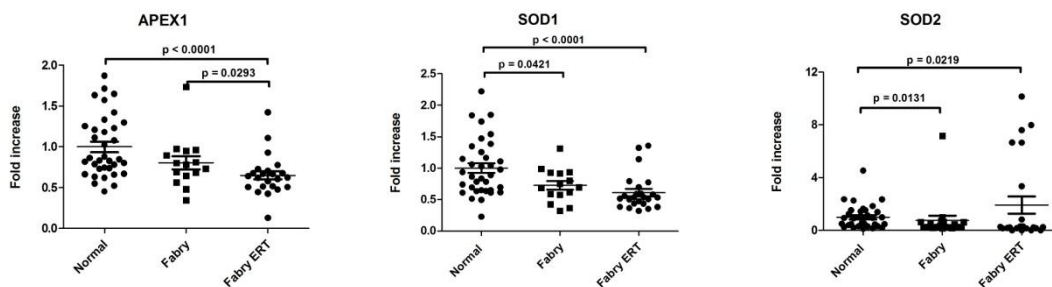
Para ello, se analizó la expresión de cinco genes relacionados al estrés del RE: HSPA5 (BiP), DDIT3 (CHOP), PPP1R15A (GADD34), EDEM1 y HSP90B1. Las medidas se realizaron por RT-qPCR sobre PBMC de pacientes con EF, con y sin ERT, y controles normales.

La expresión fue altamente variable entre las diferentes muestras de pacientes analizadas (**Figura 17**). Para el panel de genes estudiados, observamos algunos niveles de expresión excepcionalmente altos, especialmente entre pacientes Fabry bajo ERT, pero no en pacientes sin tratar. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre pacientes y controles normales. Estos resultados excluirían, en principio, la participación del estrés de RE como causa del aumento de apoptosis observado en PBMC de pacientes con EF.

### Marcadores de estrés oxidativo en PBMC en la Enfermedad de Fabry

Teniendo en cuenta el hallazgo antes descrito de una activación de la vía intrínseca de apoptosis de PBMC en la EF, asociada a la pérdida del potencial mitocondrial, decidimos indagar si existía un estado de estrés oxidativo asociado.

Las mitocondrias son una de las principales fuentes de ROS dentro de la célula, y cumplen un rol central en la apoptosis. La pérdida de integridad mitocondrial conduce irremediablemente a un aumento de ROS dentro de la célula, como parte de los eventos que



**Figura 18:** Análisis de expresión de genes relacionados al estrés oxidativo en PBMC en pacientes Fabry con y sin ERT, y controles normales.. Los valores de expresión están indicados como veces de expresión (fold increase) respecto del grupo de controles normales. Se indican con barras sobre los grupos las diferencias estadísticamente significativas, acompañadas del valor de  $p$  correspondiente (test de Mann-Whitney).

constituyen el proceso de apoptosis, pero, paradójicamente, esta pérdida de integridad puede ser a su vez desencadenada por un desbalance redox preexistente.

Para evaluar la integridad de los sistemas de manejo de ROS y la presencia de estrés oxidativo en PBMC de pacientes con EF, se midieron los niveles de expresión de tres genes asociados a la respuesta ante estrés por radicales libres y especies reactivas del oxígeno: SOD1, SOD2 y APEX1, que codifica para una endonucleasa involucrada en la reparación del daño oxidativo sobre el DNA. Las medidas se realizaron sobre PBMC de pacientes, con y sin ERT, y controles normales, mediante RT-qPCR.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 18**. Se observó un descenso de los valores de expresión de los tres genes en pacientes (con y sin ERT), comparados con los controles normales. Se hallaron descensos significativos en la expresión de SOD1 y SOD2 al comparar entre controles normales y pacientes sin tratar, mientras que al realizar la comparación entre normales y pacientes bajo ERT, APEX1 y SOD1 mostraron un descenso, mientras que SOD2 mostró un aumento significativo. En este último caso, sin embargo, es necesario notar que la distribución del grupo de pacientes con ERT es claramente bimodal. De hecho, el grupo de pacientes que estaba bajo ERT presentó una proporción de individuos con valores claramente aumentados de estos marcadores, especialmente SOD2.

Estos resultados, si bien no demuestran directamente la presencia de estrés oxidativo, podrían ser indicadores de la existencia un estado predisponente al estrés oxidativo, situación que es compatible con (y podría ser una de las causas de) el aumento en la tasa de apoptosis que se describió anteriormente en las PBMC de los pacientes con EF. Más aún, las observaciones realizadas sobre el grupo de pacientes en ERT indicarían una tendencia a revertir este estado.

## Perfil proinflamatorio en la Enfermedad de Fabry

### Introducción

Hace ya más de veinte años que se propuso la existencia de una estimulación crónica del sistema inmune en pacientes con enfermedades de almacenamiento lisosomal (Shoenfeld et al., 1982), la cual generaría una reacción inflamatoria que desencadenaría el daño celular. Existe evidencia creciente que muestra la existencia de irregularidades del sistema inmune asociadas a los desórdenes lisosomales (Castaneda et al., 2008).

En varias EL diferentes (enf. de Gaucher, enf. de Krabbe, mucopolisacaridosis), las células inmunes de los pacientes muestran un patrón de expresión de citoquinas proinflamatorias constitutivo (Barak et al., 1999; Formichi et al., 2007; Simonaro et al., 2008). En la enfermedad de Gaucher, varios estudios han demostrado una mayor secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Campeau et al., 2009; Hong et al., 2006; Kacher y Futerman, 2009), así como niveles aumentados de las quemoquinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  (Van Breemen et al., 2007). También se ha detectado un estado inflamatorio en modelos murinos de las enfermedades de Niemann Pick tipo C (Rimkunas et al., 2009), Tay-Sachs (Jeyakumar et al., 2003), Sandhoff (Kawashita, 2009) y mucopolisacaridosis (Simonaro et al., 2010).

Para la enfermedad de Fabry en particular, se han descripto un número de alteraciones inmunes. Los leucocitos y células endoteliales presentan un perfil activado, compatible con un estado protrombótico (DeGraba et al., 2000). Recientemente se ha descripto también un estado prooxidativo y proinflamatorio que correlaciona positivamente con los niveles urinarios de Gb<sub>3</sub> (Biancini et al., 2012), y la existencia de alteraciones funcionales de la subpoblación de células T NK invariantes (iNKT), que muestra rasgos proinflamatorios (Pereira et al., 2013).

El presente capítulo está dedicado al estudio de la existencia de un estado proinflamatorio en PBMC de pacientes con EF, subyacente a la patología. En particular, nos concentraremos en las subpoblaciones de PMBC relacionadas con la inmunidad innata, y analizaremos los posibles efectos que los niveles patológicamente elevados de Gb<sub>3</sub> pueden tener en la iniciación y mantenimiento de este estado.

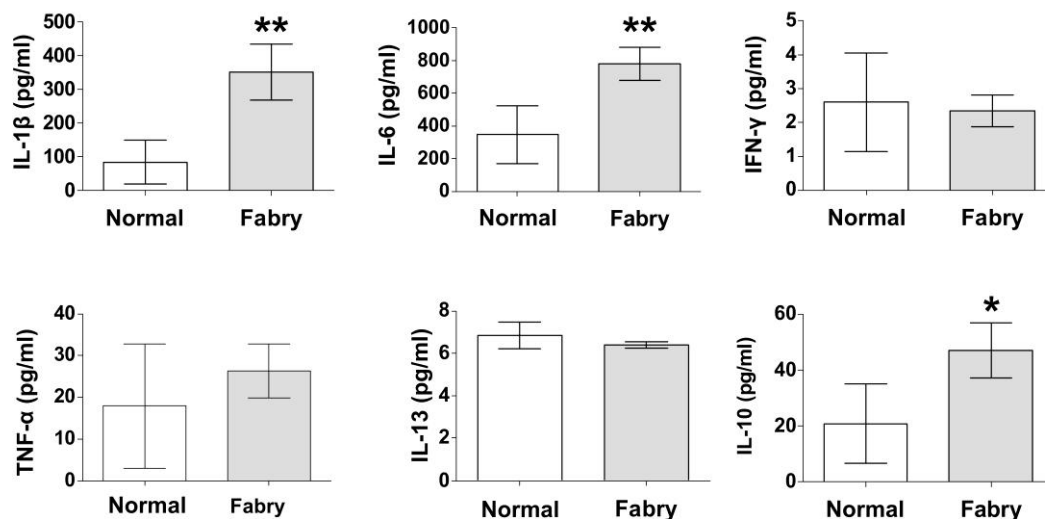


## Expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias en PBMC de Pacientes con Enfermedad de Fabry

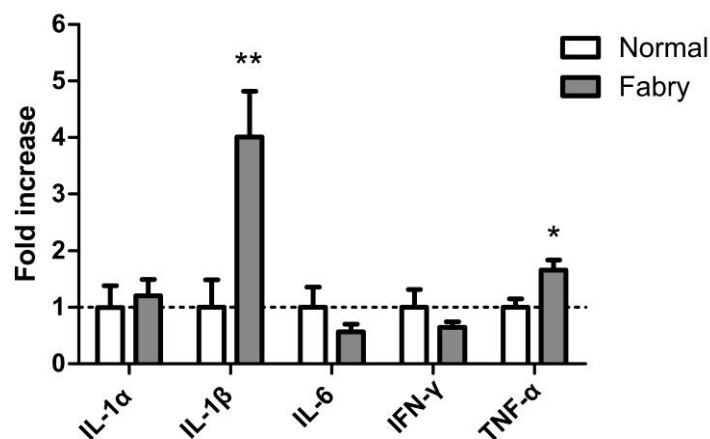
Para evaluar la existencia de un estado proinflamatorio en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) analizamos la producción de las citoquinas de las mismas en cultivo. Con tal fin se aislaron PBMC a partir de sangre periférica de pacientes y controles normales mediante gradiente de Ficoll. Se cultivaron estas células en AIM-V durante 24 hs, y se determinó la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-13 en el sobrenadante mediante ELISA de captura.

Se observó un aumento significativo en la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6 ( $p=0,0025$  y  $p=0,0019$ , respectivamente) en el sobrenadante de cultivo de PBMC de pacientes con EF comparada con la de los controles normales (Figura 19). Se halló también una mayor producción de IL-10 en las muestras de pacientes ( $p=0,034$ ), un hallazgo previamente reportado en la Enfermedad de Gaucher, que también presenta un componente proinflamatorio (Allen et al., 1997), y que puede ser interpretado como una respuesta regulatoria ante la instauración de un perfil proinflamatorio.

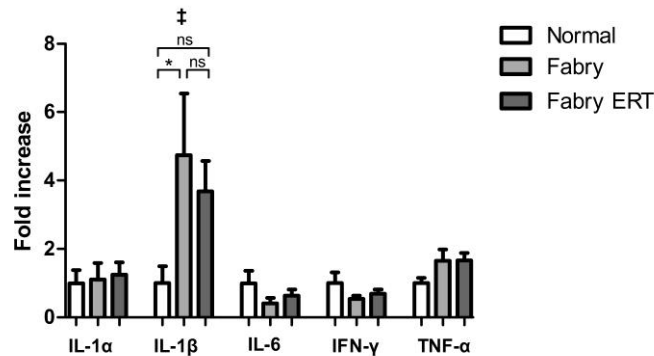
Conjuntamente se analizó el perfil de expresión de citoquinas proinflamatorias. Para ello, se purificó el ARN de  $5 \times 10^5$  PBMC, se lo retrotranscribió y se analizó el nivel de expresión de los genes de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , mediante qPCR, usando  $\beta$ -actina como estándar interno. Los niveles de expresión hallados en pacientes se indican en la **Figura 20**, expresados como aumento (*fold increase*) respecto de los niveles de controles normales.



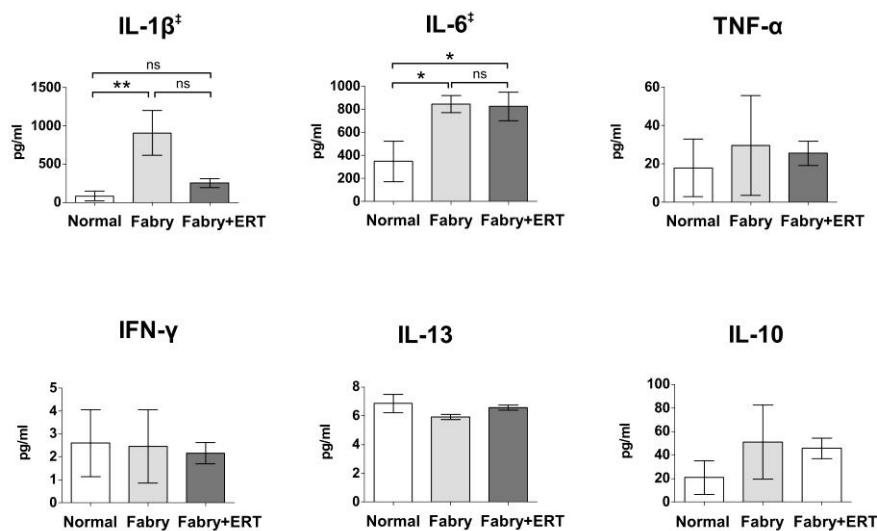
**Figura 19:** Concentración de citoquinas secretadas en sobrenadante de cultivos de PBMC de controles normales y pacientes con EF, determinada por ELISA. Se indican la media y el IC 95 %. Se señalan con uno o dos asteriscos las diferencias estadísticamente significativas (\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; prueba  $t$  de Student, con corrección de Welch si correspondiera)



**Figura 20:** Nivel de expresión de citoquinas en PBMC de pacientes con EF, determinado por RT-qPCR. Los valores se expresan como veces de aumento (fold increase) respecto de los controles normales, acompañados del SEM (según Livak y Schmittgen, 2001). Se indican con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas (\*\*  $p < 0,01$  ; \*  $p < 0,05$  ; test  $U$  de Mann-Whitney)



**Figura 21:** Expresión de citoquinas en PBMC de controles normales (barras blancas), pacientes Fabry sin tratamiento (barras gris claro) y pacientes Fabry bajo ERT (barras gris oscuro). Los valores mostrados corresponden al promedio de la expresión normalizada a la media de los controles normales (fold increase), acompañadas de su SEM correspondiente. Los grupos de barras marcados con el símbolo ‡ muestran diferencias estadísticamente significativas entre sus medias ( $p < 0,05$ , ANOVA de una vía por Kruskal-Wallis). Las diferencias estadísticamente significativas entre columnas se indican con un asterisco ( $p < 0,05$ ; test a posteriori de Dunn). ns: diferencia estadísticamente no significativa.



**Figura 22:** Concentración de citoquinas en cultivos de 24 h de PBMC de controles normales (barras blancas), pacientes Fabry sin tratamiento (barras gris claro) y pacientes Fabry bajo ERT (barras gris oscuro), medida por ELISA de captura. Se muestran las medias acompañadas de su correspondiente SEM. Los gráficos señalados con el símbolo ‡ presentan diferencias estadísticamente significativas entre sus medias ( $p < 0,05$ ; ANOVA de una vía por Kruskal-Wallis). Las diferencias estadísticamente significativas entre columnas se indican con uno o dos asteriscos (\*\*  $p < 0,05$  ó \*  $p < 0,01$ ; test a posteriori de Dunn). ns: diferencia estadísticamente no significativa.

Mediante este ensayo se detectó un ascenso en los niveles de expresión en PBMC de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  ( $p=0,0098$  y  $p=0,0496$ , respectivamente).

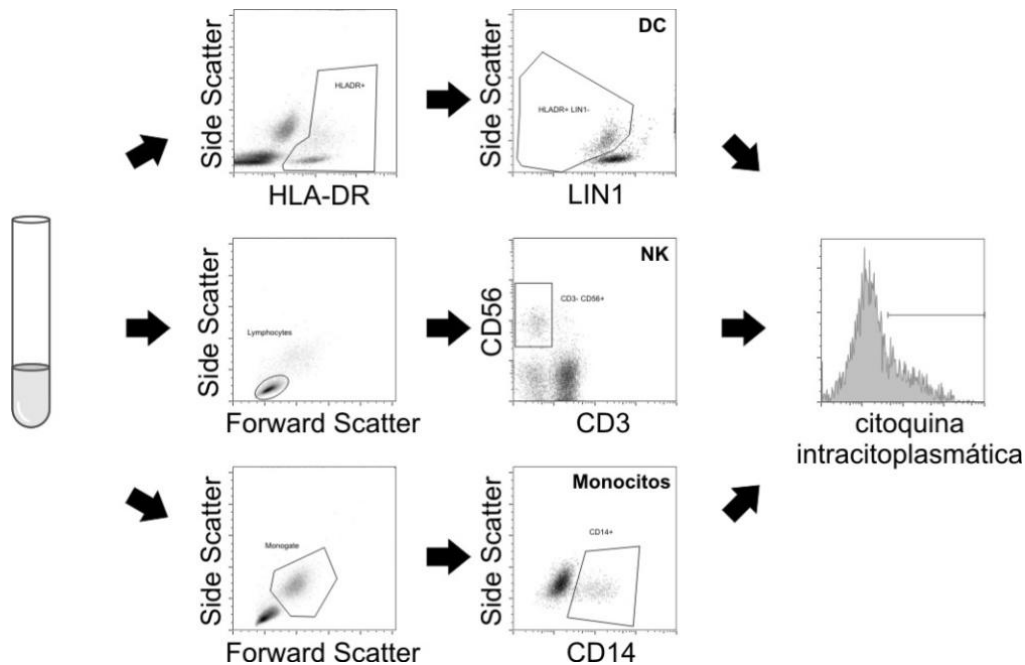
Por su parte, si se analizan los niveles de citoquinas expresados o secretados, pero discriminando entre los pacientes que se hallaban en TRE y los pacientes sin tratar, no se encontraron diferencias significativas (**Figura 21** y **Figura 22**). Debe notarse en este caso que, al realizar esta comparación discriminando los dos grupos de pacientes, algunas de las diferencias observadas anteriormente entre pacientes y controles desaparecen, debido probablemente a la pérdida de potencia estadística de las pruebas utilizadas al reducirse el número de casos de cada grupo comparado.

Considerando en conjunto los resultados obtenidos para PBMC tanto en el nivel de expresión génica de citoquinas como en la producción de citoquinas en cultivo, se pudo evidenciar que las PBMC de pacientes con EF presentan un estado compatible con el desarrollo de un perfil proinflamatorio.

### **Producción aumentada de citoquinas proinflamatorias en subpoblaciones de la inmunidad innata en sangre periférica**

Teniendo en cuenta la heterogeneidad de tipos celulares que conforman las PBMC, nos propusimos determinar la participación de diferentes subpoblaciones celulares en la producción aumentada de citoquinas proinflamatorias que fue observada en cultivos de PBMC de pacientes. Basados en el hecho de que el perfil de citoquinas anteriormente encontrado es típico de respuestas inflamatorias mediadas por células de la inmunidad innata, nos concentramos en tres subpoblaciones en particular: las células dendríticas (DC), los monocitos (MC) y las células *natural killer* (NK).

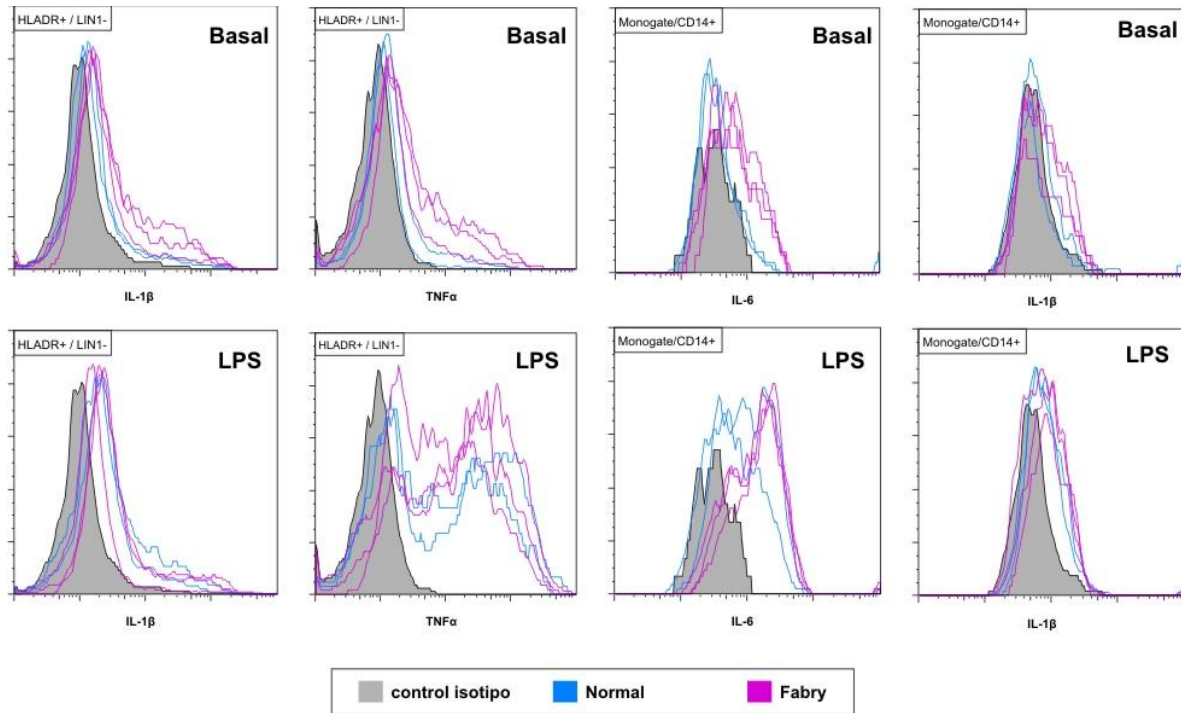
Con este fin, se realizó un cultivo de PBMC de pacientes y controles normales durante 14 hs en AIM-V en presencia de brefeldina, con y sin el agregado de LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  como estímulo proinflamatorio. Posteriormente se realizó una marcación de superficie para diferenciar las diferentes subpoblaciones, y una marcación intracitoplasmática para detectar las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . Las muestras así marcadas fueron analizadas mediante citometría de flujo.



**Figura 23:** Esquema de la estrategia de análisis (*gating*) utilizada para definir las tres poblaciones de PBMC analizadas.

La figura 23 muestra un esquema de las estrategias de análisis (*gating*) utilizadas para definir las poblaciones de DC, MC, y células NK a partir de la muestra de PBMC. En la Figura 24 se presentan de manera ilustrativa algunos histogramas representativos obtenidos para las condiciones donde se observaron diferencias significativas, mientras que en la figura 25 se muestran los resultados totales obtenidos para las subpoblaciones buscadas, indicando para las tres citoquinas marcadas los niveles de fluorescencia medio (MFI) y porcentaje de células positivas, expresados en todos los casos en valores relativos a los controles normales sin estimular.

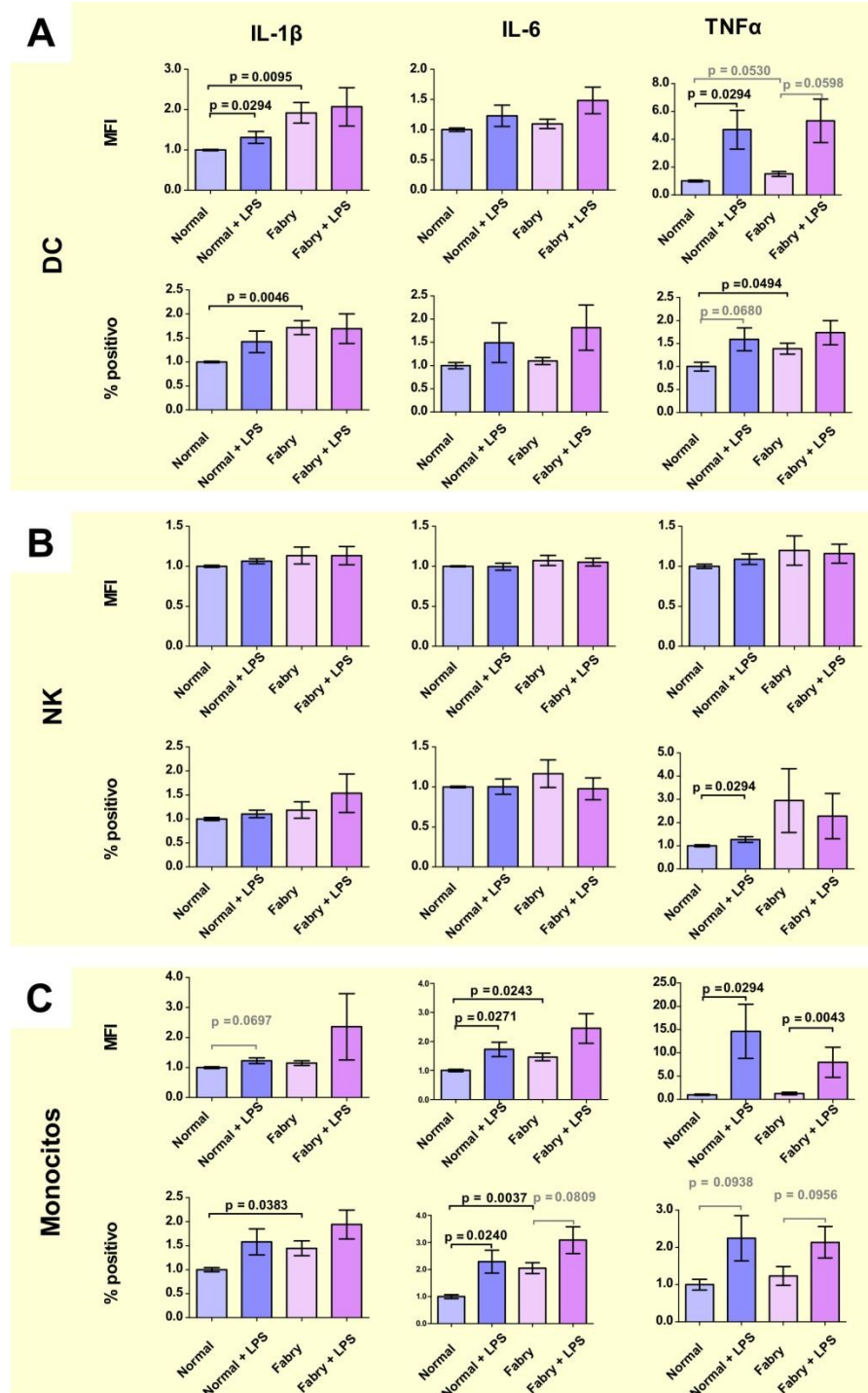
Los resultados arrojados por este análisis mostraron que los niveles basales de producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  se hallan significativamente aumentados ( $p=0,0046$  y  $p=0,0494$ , respectivamente) en las células dendríticas de pacientes con EF con respecto a los controles normales, y que esta subpoblación además presentaba una tendencia a una respuesta exacerbada de TNF $\alpha$  ante un estímulo con LPS. En monocitos, por



**Figura 24:** Histogramas de marca intracitoplasmática representativos de las citoquinas y poblaciones que mostraron diferencias significativas entre pacientes y controles.

su parte, se observó un nivel basal significativamente aumentado de IL-6 e IL-1β ( $p=0,0037$  y  $p=0,0383$ , respectivamente), y, ante el estímulo de LPS, pudo evidenciarse una tendencia de respuesta exacerbada para las tres citoquinas, respecto de los controles normales. Finalmente, en células NK no se registraron diferencias significativas.

Estos resultados nos permiten concluir que las células dendríticas y monocitos de pacientes con EF presentan un estado basal proinflamatorio, y una tendencia a desarrollar respuestas exacerbadas ante ambientes inflamatorios. Más aún, estas evidencias apoyan la hipótesis de que estas dos subpoblaciones de la inmunidad innata cumplirían un rol preponderante en el desarrollo y mantenimiento del estado previamente observado en PBMC.



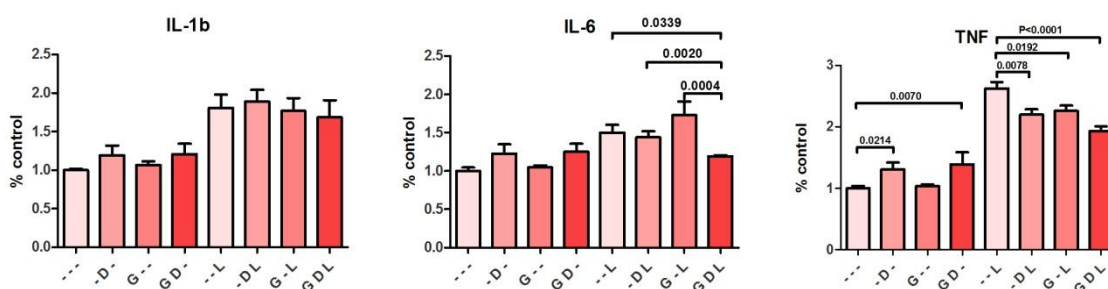
**Figura 25:** Niveles intracitoplasmáticos de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  en diferentes poblaciones de PBMC, tanto en pacientes como en controles normales, con y sin estímulo de LPS. Se muestran los resultados de fluorescencia media (MFI) y porcentaje de células positivas, expresados como valores normalizados al control sin estimular, junto con el error estándar de las medias. Las barras superiores indican las diferencias entre medias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en negro. Se indican además, en gris, las diferencias con un valor de significancia menor que 0,1 (prueba U de Mann-Whitney).

## Efecto del tratamiento *in vitro* con Gb<sub>3</sub> y DGJ sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en células THP-1

Con el fin de indagar sobre los posibles mecanismos que desencadenan el estado proinflamatorio observado en células de la inmunidad innata en EF, se realizaron ensayos en los que se modeló *in vitro* el estado de estas células en la enfermedad. Para ello, se realizaron cultivos de células normales en presencia de Gb<sub>3</sub> y de DGJ, un inhibidor competitivo de la  $\alpha$ -galactosidasa A. De esta manera se generó un medio en el cual las células se vieran enfrentadas a una exposición a niveles elevados de Gb<sub>3</sub> sin la capacidad para degradarlo.

Teniendo en cuenta que una de las subpoblaciones celulares que mostraron perfil proinflamatorio fueron los monocitos, se decidió realizar ensayos utilizando la línea monocítica humana THP-1. Para ello, se cultivaron células de esta línea durante 6 días con AIM-V en presencia o ausencia de DGJ 200  $\mu$ M, y luego se las sembró, con o sin DGJ 200  $\mu$ M, Gb<sub>3</sub> 20  $\mu$ M y/o LPS 1  $\mu$ g/ml. El sobrenadante de cultivo obtenido se analizó por ELISA.

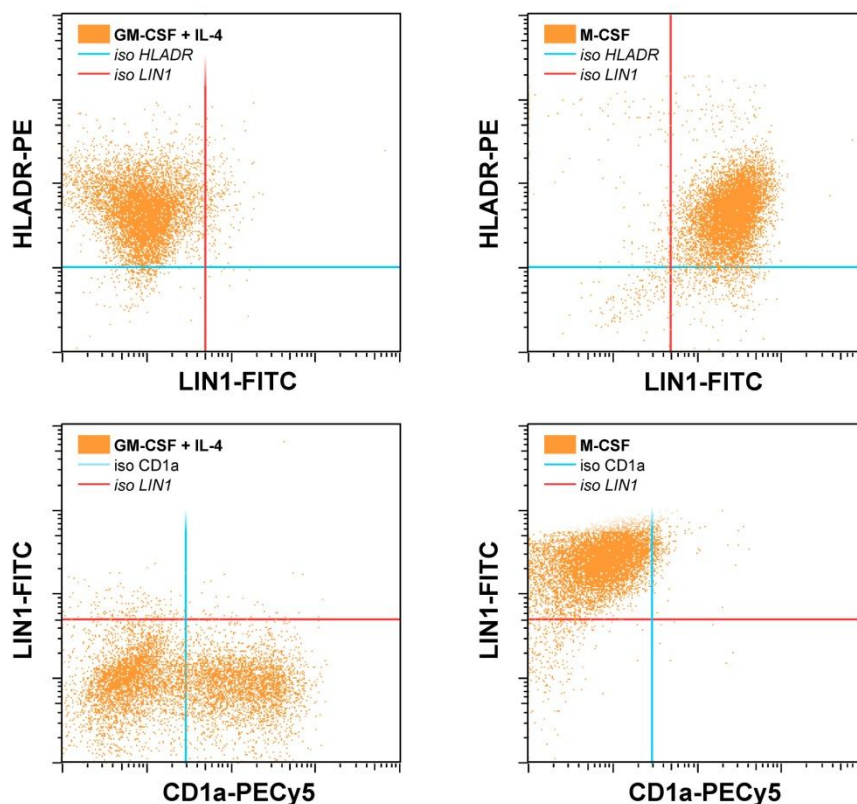
Estos experimentos mostraron una tendencia al aumento de las tres citoquinas medidas, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  frente al agregado de DGJ, siendo sólo significativo para esta última ( $p=0,0214$ ) (Figura 26). El agregado de Gb<sub>3</sub> no generó cambios apreciables. En las condiciones estimuladas con LPS se obtuvieron resultados más variables, aunque se evidenció una tendencia a la disminución en la producción de las citoquinas con el agregado conjunto de Gb<sub>3</sub> y DGJ.



**Figura 26:** Producción de citoquinas en cultivos de la línea THP-1 con el agregado de DGJ(D), Gb<sub>3</sub> (G) y/o LPS(L). Los valores mostrados son los promedios de los triplicados de cada experimento, previa normalización a la condición control, junto con el SEM. Se marcaron las diferencias estadísticamente significativas junto con su valor de p.



Efecto del tratamiento *in vitro* con Gb3 y DGJ sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en cultivos de células dendríticas y monocitos derivados a partir de PBMC normales.

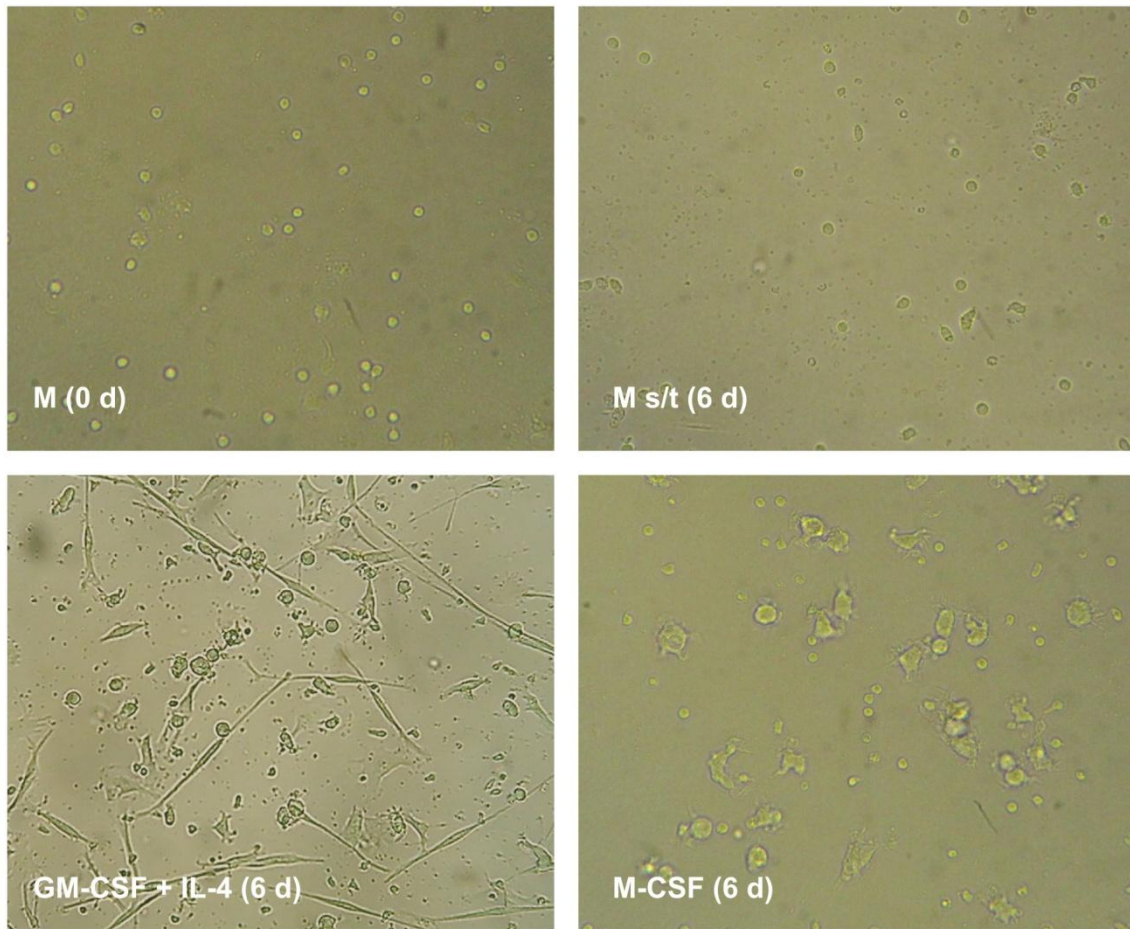


**Figura 27:** Análisis por citometría de flujo de las poblaciones obtenidas en los cultivos de DC (GM-CSF + IL-4) y MC (M-CSF) a partir de buffy coats normales. Las líneas incluidas indican los valores de corte generados a partir de los controles de isotipo correspondientes.

Los experimentos con la línea THP-1 no permitieron modelar el perfil proinflamatorio observado en la Enfermedad de Fabry, probablemente por tratarse de una línea tumoral con secreción basal de citoquinas proinflamatorias.

## Efecto del tratamiento *in vitro* con Gb<sub>3</sub> y DGJ sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en cultivos de células dendríticas y monocitos derivados a partir de PBMC normales.

Con el objetivo de obtener un sistema que reproduzca más fielmente las condiciones de las subpoblaciones de PBMC originalmente estudiadas, se realizaron cultivos de DC y MC/MΦ a partir de concentrados leucoplaquetarios (*buffy coats*) de donantes normales



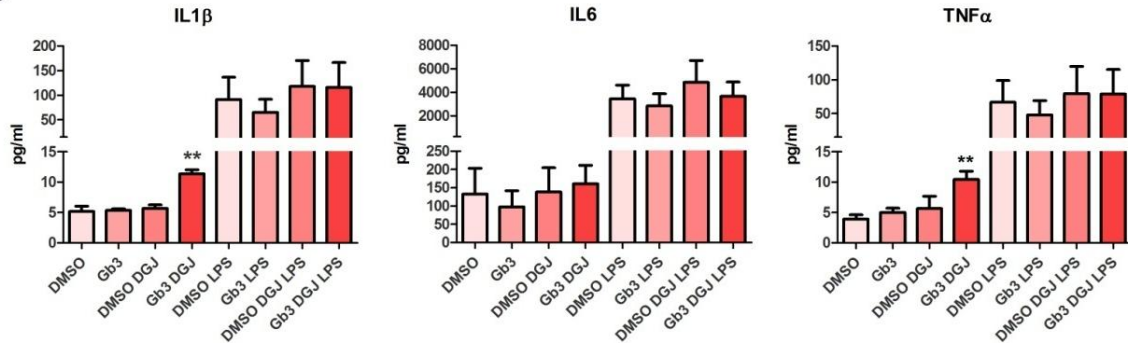
**Figura 28:** microscopía de monocitos (M) inmediatamente luego de purificarlos de un concentrado leucoplaquetarios (0 días), sin tratamiento a los 6 días, tratados con GM-CSF + IL-4 (DC) a los 6 días, y tratados con M-CSF (MC/MΦ) a los 6 días. En estas dos últimas se puede observar un cambio marcado en la morfología.

(Palucka et al., 1998). Para ello se separaron PBMC de estas muestras mediante gradiente de Ficoll, las cuales fueron enriquecidas en células adherentes cultivándolas por 1h y descartando las células no adheridas mediante lavados, y luego fueron cultivadas por 6 días en condiciones de diferenciación a DC (agregado de GM-CSF e IL-4) y de mantenimiento de MC/MΦ (agregado de M-CSF). Pasado este lapso las células fueron cosechadas y cultivadas por 24hs con el agregado de Gb<sub>3</sub> 20 μM, DGJ 200 μM y/o LPS 1 μg/ml. Los niveles de citoquinas obtenidos en el sobrenadante de cultivo se determinaron mediante ELISA de captura.

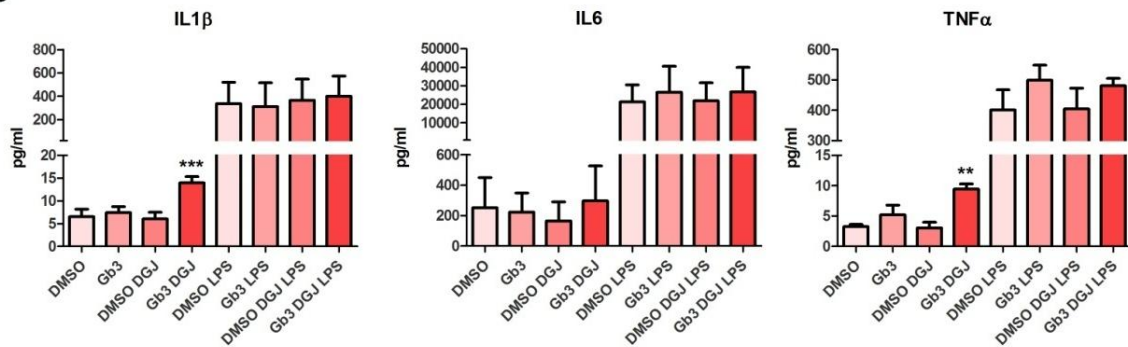
En la **figura 27** se ilustran los resultados obtenidos para los cultivos mediante análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo al momento de cosechar las células para

Efecto del tratamiento in vitro con Gb<sub>3</sub> y DGJ sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en cultivos de células dendríticas y monocitos derivados a partir de PBMC normales.

## DC



## MC



**Figura 29:** Niveles de citoquinas en sobrenadante de cultivo de DC y MC/M $\Phi$  obtenidas de buffy coats normales en cultivo con Gb<sub>3</sub>, DGJ y/o LPS. Se indican con asteriscos las diferencias significativas respecto del control correspondiente (-/+ LPS). \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; prueba t de Student apareada.

realizar los estímulos. Se puede apreciar cómo el cultivo con M-CSF mantiene los marcadores típicos de monocitos, CD14 (visto como LIN1) y HLA-DR, mientras que las células cultivadas con GM-CSF e IL-4 mantienen HLADR, pero pierden la expresión de CD14 (y por ende LIN1), y un porcentaje alto de ellas comienza a expresar CD1a. La **figura 28** muestra los cambios morfológicos que se observan por el tratamiento de diferenciación a DC y MC/M $\Phi$ .

Cuando se analizan los resultados obtenidos sin el estímulo de LPS, ya sea para los cultivos de DC como los de MC, se puede observar un aumento significativo en los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (en DC p=0,0018 y p=0,0041; en MC p=0,0002 y p=0,0054; ambos respectivamente) cuando se agregan conjuntamente Gb<sub>3</sub> y DGJ (**Figura 29**). Ante el estímulo

con LPS, estas diferencias entre los tratamientos desaparecen, dado que la exposición a LPS genera niveles muy aumentados de citoquinas que enmascararían las diferencias observadas sin el agregado de LPS.

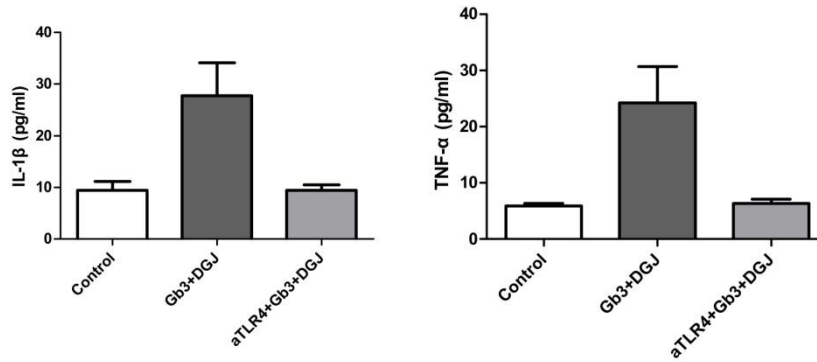
Estos experimentos mostraron que mediante el agregado conjunto de Gb<sub>3</sub> y DGJ se puede inducir sobre cultivos normales de las dos subpoblaciones de la inmunidad innata estudiadas un estado proinflamatorio similar al observado en PBMC de pacientes con EF. Esto podría estar directamente asociado a la fisiopatogenia del estado proinflamatorio en la EF, ya que las células sanguíneas de los pacientes se hallan constantemente expuestas a niveles altos de Gb<sub>3</sub> plasmático, y las mismas carecen de la actividad enzimática específica para degradarlo de manera eficiente.

El perfil de moléculas expresadas en las diversas enfermedades de almacenamiento lisosomal es característico de la activación de la respuesta inmune innata. La respuesta inmune innata se desencadena mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por receptores en la membrana plasmática llamados *Toll-like receptors* (TLRs) (O'Neill, 2008) y/o receptores citosólicos denominados *Caterpillar* o *NOD-like receptors* (NLRs) (Mariathasan y Monack, 2007). Además, hay indicios que indican que señales de estrés, moléculas de origen endógeno o de injuria tisular podrían activar estos mecanismos.

En las enfermedades de almacenamiento lisosomal, debido al estrés celular o a la alta cantidad de sustancias acumuladas, podría existir algún mecanismo de activación de la respuesta inmune innata, del mismo modo que ocurre en las enfermedades autoinflamatorias. Según bibliografía, varios TLR reconocen moléculas con porciones lipídicas, como TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6. No se conoce el perfil de reconocimiento de los NLR en su totalidad. No se sabe actualmente si el Gb<sub>3</sub> acumulado en Enfermedad de Fabry podría llegar a actuar como un PAMP, siendo reconocido por algún receptor de reconocimiento de patrones (PRR).

El siguiente paso en este trabajo se orientó al estudio del mecanismo por el cual se desarrollan los eventos proinflamatorios que observamos ante el agregado de Gb<sub>3</sub> y DGJ, que resultaba de gran interés. Una de las hipótesis que se decidieron probar era si el receptor tipo toll-4 (TLR-4) estaba involucrado en el proceso observado, ya que en la bibliografía se lo había asociado a respuestas proinflamatorias en otras patologías, tanto enfermedades lisosomales

Efecto del tratamiento in vitro con Gb3 y DGJ sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en cultivos de células dendríticas y monocitos derivados a partir de PBMC normales.



**Figura 30:** Producción de IL-1β y TNF-α en MC/MΦ derivados de monocitos, cultivados con control de isotipo + vehículo (Control), control de isotipo + Gb<sub>3</sub> + DGJ (Gb<sub>3</sub>+DGJ), y anticuerpo bloqueante de TLR-4 + Gb<sub>3</sub> + DGJ (αTLR4+ Gb<sub>3</sub>+DGJ). Los resultados mostrados son el promedio de dos experimentos independientes.

como debidas a liberación de glicolípidos (Jou et al., 2006; Simonaro et al., 2010; Suzuki et al., 2007).

Para ello, se trataron previamente MC/MΦ derivados de concentrados leucoplaquetarios normales con un anticuerpo bloqueante para el receptor TLR-4 o su control de isotipo, y posteriormente agregó Gb<sub>3</sub> y DGJ, o control de vehículo, y se los cultivó por 14 hs, al cabo de las cuales se determinaron citoquinas en el sobrenadante.

En los resultados obtenidos se observa que el bloqueo de TLR-4 en estas células inhibe completamente el aumento de producción de citoquinas proinflamatorias que produce el tratamiento conjunto de Gb<sub>3</sub> y DGJ (**Figura 30**). Esto indicaría que el receptor TLR-4 es un componente necesario para la generación del estado proinflamatorio asociado a niveles elevados de Gb<sub>3</sub> observado en las células de la inmunidad innata en la EF.



## Discusión y Conclusiones

### Discusión

Desde hace tiempo se ha observado que tanto los monocitos, como los linfocitos B y T, y las células NK se encuentran afectadas por la acumulación lisosomal en diferentes trastornos de almacenamiento lisosomal (Brück et al., 1991; Kieseier y Goebel, 1994; Kieseier et al., 1997).

A través del extenso uso de un anticuerpo monoclonal específico contra Gb<sub>3</sub> se ha logrado demostrar la existencia de depósitos específicos de Gb<sub>3</sub> en riñón, biopsias cardíacas, conjuntiva, piel y cerebro de pacientes con enfermedad de Fabry (Askari et al., 2007; Rozenfeld et al., 2006). Sin embargo, no se había descrito hasta el momento la existencia de depósitos de Gb<sub>3</sub> en leucocitos en la enfermedad de Fabry.

Mediante el uso de este anticuerpo específico para Gb<sub>3</sub> y la citometría de flujo, en el presente trabajo hemos sido capaces de demostrar un contenido intracelular significativamente aumentado de este glicolípido en leucocitos de pacientes con enfermedad de Fabry. Esta observación se complementa con las realizadas a través de la microscopía electrónica de transmisión, donde se ha podido detectar en leucocitos provenientes de pacientes con enfermedad de Fabry la presencia inclusiones con morfología de cuerpos

lamelares, similares a los observados en otros tejidos afectados en esta enfermedad, y clásicamente interpretados como acúmulos intracelulares de Gb<sub>3</sub>.

El presente estudio también reveló una serie de alteraciones numéricas en varias subpoblaciones de leucocitos de sangre periférica de los pacientes con enfermedad Fabry. Se observaron números específicamente reducidos de monocitos, células CD8<sup>+</sup> y células dendríticas, y porcentajes aumentados de linfocitos totales y de células B. Sin embargo, los valores de las células CD8<sup>+</sup> y células dendríticas mieloides en los pacientes Fabry que estaban bajo ERT se mostraron inalterados, no existiendo diferencias significativas respecto de los controles normales. También han sido reportados desequilibrios en el número de linfocitos en la enfermedad de Gaucher (Burstein et al., 1987; Micheva et al., 2006). Las causas potenciales de esta reducción del número de células inmunes podrían ser una reducción de la producción de células madre de médula ósea, una mayor tasa de apoptosis y/o una mayor migración a los tejidos periféricos. Evidencias de este último mecanismo han sido descriptas por De Graba (DeGraba et al., 2000), que mostraron una mayor expresión de CD11b y CD18 en monocitos de los pacientes con Fabry. Por otra parte se ha descrito en una línea Fabry de células endoteliales vasculares expuestas a Gb<sub>3</sub> la sobreexpresión de varias moléculas de adhesión (Shen et al., 2008). En el presente estudio, hemos detectado la sobreexpresión de CD31, otra molécula que se halla implicada en los procesos de extravasación.

Tanto CD1d como el MHC de clase II son moléculas implicadas en la presentación antigénica de glicolípidos y péptidos, respectivamente. Ambas moléculas se mueven a través de compartimientos endolisosomales, que podrían verse afectados por los depósitos de glicolípidos que se producen en la enfermedad de Fabry. La expresión de las moléculas de MHC clase II y CD1d está independientemente regulada por varios factores, entre los que se incluye la acumulación de esfingolípidos (Balreira et al., 2008; Cabrita et al., 2005). En nuestro trabajo observamos patrones de expresión antagónicos de estas dos moléculas en los pacientes con enfermedad de Fabry. La menor expresión de CD1d observado en células de pacientes Fabry podría ser el resultado de la perturbación de ciertos mecanismos celulares por el depósito de glicolípidos, y no de un cambio en el estado de activación de estas células, lo que daría lugar a una sobreexpresión de esta molécula. En contraste, hemos encontrado una sobreexpresión del MHC de clase II en la membrana plasmática de los monocitos de pacientes



con Fabry, lo que podría estar relacionado con el estado proinflamatorio que posteriormente describimos en estos pacientes.

Uno de los objetivos de este trabajo fue indagar si la apoptosis podría desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad de Fabry, e investigar las posibles causas subyacentes que provocan los eventos apoptóticos. Nuestros resultados muestran que las PBMC de pacientes Fabry presentan un perfil elevado de marcadores de apoptosis, que fueron puestos en evidencia por la evaluación de eventos tempranos y tardíos. Además, pudimos observar que las células mononucleares de pacientes con Enfermedad de Fabry no tratados presentan un estado apoptótico más marcado que los pacientes que se hallaban sometidos a ERT. Esta apoptosis aumentada observada en PBMC podría llegar a interpretarse como una de las causas que conducen a las alteraciones numéricas que observamos en varias subpoblaciones de leucocitos de sangre periférica, como se expuso anteriormente.

Más aún, hemos podido demostrar que la apoptosis está mediada, al menos parcialmente, por la activación de caspasas, mediante la detección de niveles más altos de la caspasa 3, de rol central en la vía efectora común de apoptosis, en muestras de pacientes con enfermedad de Fabry. Este hallazgo se encuentra en concordancia con un estudio de hibridación en chip (*microarray*) realizado con células de sangre periférica de niños con enfermedad de Fabry, donde sobre 54.000 genes investigados sólo se hallaron diferencialmente expresados 21 genes, dos de ellos relacionados con apoptosis: la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal y el factor inductor de apoptosis (AIF) (Moore et al., 2008).

Dado que no se pudieron observar diferencias en los niveles de procaspasa 3 entre los pacientes tratados y no tratados, el mecanismo por el cual la ERT reduce los niveles de apoptosis podría incluir eventos que se dan con posterioridad (*downstream*) a la activación de la caspasa 3.

La apoptosis parece ser un hallazgo común en varias EL, tales como la lipofuscinosis ceroides neuronal infantil (Zhang et al., 2006), algunas mucopolisacaridosis (Hamano et al., 2008), la enfermedad de Niemann Pick (Li et al., 2005), y las enfermedades de Tay-Sachs y de Sandhoff (Huang et al., 1997). Este fenómeno de apoptosis podría reflejar un problema relacionado con el depósito lisosomal en sí mismo, independientemente del sustrato específico acumulado. Sin embargo, el mecanismo en particular que conduce a la apoptosis

podría ser específico para cada trastorno. En las enfermedades de Tay-Sachs y Sandhoff, la reacción inflamatoria conduce a una fase de rápida apoptosis neuronal (Oya et al., 2000), mientras que el aumento de los niveles de dermatán sulfato y/o de citoquinas inflamatorias conduce a la apoptosis de condrocitos en mucopolisacaridosis VI (Simonaro et al., 2001). La apoptosis mediada por vía intrínseca se observó en cerebro para el modelo murino de la enfermedad de Gaucher, donde se detectó una regulación negativa en la expresión del represor de apoptosis Bcl-2 (Hong et al., 2004). La vía de caspasas extrínseca está implicada en los procesos de apoptosis descritos en la gangliosidosis GM1/GM2 (Jeyakumar et al., 2003) y en la enfermedad de Niemann Pick tipo C (Wu et al., 2005). En este contexto, el presente trabajo contribuye con la observación de activación de la vía intrínseca de muerte celular asociada al aumento de apoptosis en PBMC de pacientes con Enfermedad de Fabry.

Si bien en nuestro estudio observamos niveles elevados de caspasa 12 en las muestras de pacientes con Enfermedad de Fabry, comparadas con las de controles normales, esta caspasa probablemente no sea funcional en seres humanos (Momi, 2004). Por esta razón, se analizaron los niveles de caspasa 4, la caspasa humana homóloga probablemente relacionada con el estrés del RE, pero se observaron resultados variables. Para aclarar aún más la posible contribución del estrés del RE en la muerte celular por apoptosis observada, investigamos la expresión de 5 genes relacionados con el estrés del RE. No se pudieron observar diferencias significativas en la expresión de estos genes entre pacientes no tratados y los controles normales, descartando así la posibilidad de que el estrés del RE esté involucrado en la muerte celular apoptótica de PBMC en la enfermedad de Fabry. Un hallazgo similar fue reportado para un modelo neuropático de enfermedad de Gaucher, donde no se pudo observar la activación de la UPR (Farfel-Becker et al., 2009b). La conclusión del informe de Wei et al., que sugiere que el estrés del RE es un mediador común de apoptosis tanto en EL neurodegenerativas y como no neurodegenerativas (Wei et al., 2008) no debe ser generalizada para todos las EL. Curiosamente, en nuestro trabajo un pequeño número de pacientes sometidos a ERT mostró un perfil elevado de expresión de genes de estrés del RE, lo que constituye una observación inesperada que podría investigarse más a fondo en trabajos posteriores.

Para investigar la hipótesis de que el Gb<sub>3</sub> se asocia a la muerte celular apoptótica, se trataron PBMC normales con Gb<sub>3</sub> en concentraciones similares a las encontradas en pacientes con Fabry. De hecho, el agregado de Gb<sub>3</sub> produjo una inducción de la apoptosis dosis

dependiente en células normales. Además, se produjo una alteración del  $\Delta\Psi_m$ , lo que confirma la participación de la vía intrínseca mitocondrial en la apoptosis inducida por Gb<sub>3</sub>. Estos resultados son específicos del Gb<sub>3</sub>, ya que un tratamiento similar con glucosilceramida no logró reproducirlos. Curiosamente, estos resultados no se modificaron cuando la actividad de  $\alpha$ Gal fue inhibida mediante la incubación previa con DGJ, lo que indicaría que los efectos observados para el tratamiento de PBMC con Gb<sub>3</sub> no están relacionados con la degradación del Gb<sub>3</sub> dentro de los lisosomas, lo que a su vez podría explicar los tiempos cortos para los cuales estos efectos son claramente detectables.

La pérdida del  $\Delta\Psi_m$  precediendo la desintegración nuclear, una característica típica de la apoptosis, se asocia con un aumento de especies reactivas de oxígeno y la elevación del calcio citosólico (Macho et al., 1997). La disminución de  $\Delta\Psi_m$  durante la apoptosis podría estar asociada a la transición de permeabilidad debida a la actividad del un complejo multiproteico asociado a ambas membranas mitocondriales, y que participa en el eflujo de calcio de estas organelas debido a una elevación en el calcio mitocondrial (Kroemer et al., 1998). Además, se ha demostrado que la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  está implicada en la liberación de la oxidorreductasa mitocondrial AIF (Susin et al., 1999), codificada por uno de los genes que se había observado sobreexpresado en la enfermedad de Fabry (Moore et al., 2008). Durante la señalización de la apoptosis, tanto AIF como el citocromo c se liberan desde la mitocondria al citosol, dando lugar a la activación de las vías de caspasas.

Como se relató anteriormente, el estrés oxidativo es considerado en la actualidad un factor relevante en la fisiopatología de muchas EL (Vitner et al., 2010). Para la Enfermedad de Fabry en particular, se demostró que el Gb<sub>3</sub> es capaz de inducir un estado de estrés oxidativo sobre el endotelio vascular (Shen et al., 2008).

Por su parte, en el presente trabajo se investigó la posible existencia de alteraciones en los mecanismos de homeostasis de las especies reactivas del oxígeno en las PBMC de los pacientes. Para ello, se determinó la expresión de SOD1, SOD2 y APEX1, tres genes que codifican para proteínas con función protectora ante un ambiente oxidante. Se encontró que las PBMC de los pacientes tienen valores reducidos de expresión para estos genes, comparadas con las de controles normales. Este hallazgo contrasta con otros reportes bibliográficos, en los cuales se hallaron niveles de expresión aumentados de SOD2 y APEX1

asociados a otras EL, interpretando este aumento como una respuesta ante un estado crónico de estrés oxidativo (Deganuto et al., 2007; Wei et al., 2008).

Tanto SOD2 como APEX1 están regulados negativamente por p53 (Drane et al., 2001; Zaky et al., 2008), un factor de transcripción que se activa ante daño del ADN u otras formas de estrés, y que induce detención del ciclo celular o apoptosis, dependiendo del contexto celular y severidad de la injuria. Este factor activa varios genes blanco que están involucrados en la vía mitocondrial de apoptosis, que comprende, entre otros eventos, la pérdida del potencial mitocondrial.

Resultados preliminares de nuestro grupo, obtenidos mediante análisis de arreglos (*arrays*) de expresión, indicarían que el gen que codifica para p53, TP53, se encontraría sobreexpresado en pacientes Fabry respecto de controles normales. En este contexto, los resultados obtenidos para la expresión de los genes antes mencionados podrían interpretarse como indicativos de la existencia de un estado predisponente al estrés y daño oxidativo. Si bien este enfoque es por el momento especulativo, estaría en concordancia con las observaciones de apoptosis aumentada en PBMC de pacientes con Enfermedad de Fabry. Serán necesarios estudios adicionales que ahonden en esta temática para poder comprender la red de eventos involucrados.

El concepto de la existencia de un estado de estimulación crónica del sistema inmune en las EL ha sido introducido hace ya mucho tiempo (Shoenfeld et al., 1982), a través del hallazgo de un aumento en los niveles de citoquinas en el suero de los pacientes afectados. Sin embargo, el mecanismo que explicara estas observaciones estaba lejos de ser dilucidado. En años recientes se han intensificado los esfuerzos para aclarar este aspecto clave. La producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  parece ser un fenómeno común entre una amplia gama de EL (Castaneda et al., 2008). En particular, una publicación reciente mostró un aumento de los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-6 en pacientes con enfermedad de Fabry tratados (Biancini et al., 2012). Otro trabajo de publicación aún más reciente halló alteraciones funcionales asociadas a la células iNKT en pacientes, las cuales muestran un sesgo hacia un fenotipo proinflamatorio (Pereira et al., 2013). Los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan y enfatizan estos hallazgos, y añaden una visión de los mecanismos moleculares inmunológicos que conducen a este estado proinflamatorio observado en la enfermedad de

Fabry. En el presente trabajo, hemos puesto de manifiesto por primera vez un aumento en la expresión constitutiva y los niveles de secreción de estas citoquinas en PBMC de pacientes con enfermedad Fabry. Además, nuestros resultados demuestran que los monocitos y las células dendríticas serían precisamente la fuente de estas citoquinas.

El rol que cumple el Gb<sub>3</sub> en la fisiopatología de la enfermedad de Fabry no se conoce completamente. Aunque la acumulación de Gb<sub>3</sub> ha sido bien establecida en diferentes tejidos de pacientes con enfermedad de Fabry (Askari et al., 2007), este hecho por sí mismo no permite explicar todas las alteraciones observadas en la enfermedad de Fabry. Si bien al momento los mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la enfermedad de Fabry no se han elucidado plenamente, se han descrito algunos efectos del Gb<sub>3</sub> y otras moléculas relacionadas como mediadores de procesos patológicos clave en esta patología. El Gb<sub>3</sub> se ha relacionado con la vasculopatía en la enfermedad de Fabry describiendo su rol de inductor del estrés oxidativo y del aumento de expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular (Shen et al., 2008). En este contexto, Namdar et al observaron que VCAM-1 se regula positivamente después del tratamiento con Gb<sub>3</sub> sólo en células endoteliales microvasculares (Namdar et al., 2012), lo que sugiere que el Gb<sub>3</sub> induce un fenotipo proinflamatorio en la enfermedad. La disfunción microvascular observada podría ser una pista respecto de los cambios fisiopatológicos cardíacos iniciales que pueden tener lugar en los pacientes con enfermedad de Fabry. Se ha descrito también que la globotriaosilesfingosina (lisoGb<sub>3</sub>), un producto de desacilación del Gb<sub>3</sub>, tiene capacidad de estimular el crecimiento del músculo liso vascular (Aerts et al., 2008) y puede estar vinculada a la hipertrofia de las paredes arteriales asociada a la enfermedad de Fabry (Kalliokoski et al., 2006). Los depósitos glicolípidos también se asocian a la patología renal. El lisoGb<sub>3</sub> promueve la liberación de mediadores críticos en el proceso de lesión glomerular asociada a citoquinas inflamatorias (Sanchez-Niño et al., 2011). Nuestros hallazgos previamente relatados del efecto proapoptótico que el Gb<sub>3</sub> tiene sobre las PBMC contribuyen a esta lista cada vez mayor de acciones del Gb<sub>3</sub> que van más allá de su mera acumulación.

A través de la investigación de los efectos que tiene la exposición a niveles patológicos de Gb<sub>3</sub> en células dendríticas y macrófagos normales, nuestro trabajo pone de manifiesto un papel patogénico nuevo del Gb<sub>3</sub>, asociado a la liberación de citoquinas proinflamatorias. Una vez más, nuestros resultados están en consonancia con los de Biancini (Biancini et al., 2012),

quien muestra una correlación directa entre el Gb<sub>3</sub> y las citoquinas proinflamatorias. Es valioso poner de manifiesto el hecho de no haber hallado ninguna diferencia en cuanto al estado inflamatorio entre los pacientes Fabry no tratados y tratados, tanto en nuestro trabajo como el de Biancini. Este hallazgo podría reforzar la necesidad de analizar la inclusión de terapias complementarias a la ERT en la enfermedad de Fabry, tales como el uso de anti-inflamatorios no esteroideos. Algunas EL, tales como la enfermedad de Gaucher, han sido clasificados como un subgrupo dentro de los trastornos autoinflamatorios (Galon et al., 2000). Estos trastornos son patologías del sistema inmune innato, carentes de rasgos distintivos de la inmunidad adaptativa, donde las células mieloides efectoras y las moléculas típicamente asociadas a la inmunidad innata juegan un papel preponderante en la patogénesis (Masters et al., 2009). Los trastornos autoinflamatorios se caracterizan por aumento de la secreción de IL-1 $\beta$  (Dinarello, 2009), probablemente causado por el reconocimiento de señales propias anormales o de peligro en las células lesionadas (Martinon et al., 2006). Los miembros de la familia de IL-1 tienen efectos indirectos en la respuesta inmune, ya que no afectan a la función de linfocitos directamente, sino que promueven la liberación de quemoquinas y otros mediadores proinflamatorios. En particular, la IL-1 $\beta$  también promueve la expresión de moléculas de adhesión. Ambos efectos favorecen la infiltración del tejido, que finalmente resulta en una remodelación tisular debido a la inflamación crónica inducida por IL-1 $\beta$ . La enfermedad de Fabry presenta varias características que son similares a las de los trastornos autoinflamatorios. La presencia de un ambiente proinflamatorio, junto con una activación endotelial alterada (Rombach et al., 2010b) proporciona un medio donde los procesos autoinflamatorios se ven favorecidos. En este contexto, nuestros hallazgos de un perfil de citoquinas proinflamatorias en circulación asociadas a subpoblaciones inmunes innatas en los pacientes con enfermedad Fabry apoyarían esta noción de una naturaleza autoinflamatoria inherente a los procesos involucrados, donde los depósitos de Gb<sub>3</sub> podrían ser reconocidos como señales de peligro o de estrés. Además, las alteraciones patológicas del tejido son un hallazgo frecuente en los órganos blanco de la enfermedad de Fabry. La remodelación renal y del ventrículo izquierdo en la enfermedad de Fabry es inducida por depósitos glicolípidos principalmente en los podocitos y los miocitos cardíacos, respectivamente, lo que conduce a esclerosis, fibrosis e inflamación (Sanchez-Niño et al., 2011; Weidemann et al., 2005).

El mecanismo molecular por cual los depósitos anormales en las EL desencadenan la producción de citoquinas proinflamatorias constituye un campo de intensa investigación en la actualidad. Existe una cantidad considerable de evidencia respecto de la participación del TLR4, un miembro de la familia de receptores Toll-like que resulta clave para el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata. En las mucopolisacaridosis, Simonaro et al informaron de la contribución de la activación de TLR4 inducida por glicosaminoglicanos en la secreción de citoquinas (Simonaro et al., 2010). Los gangliósidos, que se acumulan en gangliosidosis GM1 o GM2, funcionan como ligandos endógenos para TLR4 , provocando una respuesta inflamatoria (Jou et al., 2006). La activación de la señalización por TLR4 también se encontró en la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C (Suzuki et al., 2007). En este trabajo se muestran evidencias de que el Gb<sub>3</sub> podría ser una nueva molécula con capacidad de evocar la producción de citoquinas mediada por TLR4. Será necesaria investigación adicional para poder esclarecer los detalles particulares de este proceso





## Conclusiones

Las conclusiones principales que se desprenden del presente trabajo de tesis son:

- Los leucocitos circulantes en los pacientes con Enfermedad de Fabry presentan una serie de alteraciones, tanto numéricas como en los niveles de expresión de marcadores de superficie de las diferentes subpoblaciones, así como alteraciones ultraestructurales compatibles con la acumulación lisosomal de glicolípidos.
- Las PBMC de los pacientes presentan niveles basales de apoptosis más elevados que los controles normales, lo que se evidencia por la observación de eventos tempranos y tardíos de apoptosis. Además, este proceso se ve acompañado de la activación de caspasas asociadas a la vía intrínseca de apoptosis.
- El tratamiento de PBMC normales con Gb<sub>3</sub> en niveles comparables a los presentes en el plasma de los pacientes genera un aumento en la tasa apoptosis, que es dosis-dependiente, y es específico de este lípido e independiente de la actividad de αGal presente en las células. Esto apoya nuestra hipótesis de que el Gb<sub>3</sub> juega un rol central en la fisiopatología inmune en la Enfermedad de Fabry
- Las PBMC de los pacientes no muestran activación de las vías de respuesta al estrés asociado al retículo endoplásmico, mientras que presentarían un estado predisponente al estrés oxidativo.
- Las PBMC de pacientes con Enfermedad de Fabry presentan un perfil de expresión y producción de citoquinas de características proinflamatorias. La generación de este perfil está asociada a las células de la inmunidad innata, principalmente células dendríticas y monocitos/macrófagos.
- El tratamiento de células dendríticas o macrófagos normales con Gb<sub>3</sub> y DGJ produce un perfil de secreción de citoquinas proinflamatorias similar al observado en las células de pacientes. El receptor de la inmunidad innata TLR-4 parece estar involucrado en este proceso. Estos datos señalarían otra arista del rol del Gb<sub>3</sub> en la fisiopatología inmune de la EF, y están en concordancia con nuestras hipótesis iniciales.



## Referencias

- Abe, A., Gregory, S., Lee, L., Killen, P.D., Brady, R.O., Kulkarni, A., Shayman, J.A., 2000. Reduction of globotriaosylceramide in Fabry disease mice by substrate deprivation. *J. Clin. Invest* 105, 1563-1571.
- Aerts, J.M., Groener, J.E., Kuiper, S., Donker-Koopman, W.E., Strijland, A., Ottenhoff, R., Van Roomen, C., Mirzaian, M., Wijburg, F.A., Linthorst, G.E., Vedder, A.C., Rombach, S.M., Cox-Brinkman, J., Somerharju, P., Boot, R.G., Hollak, C.E., Brady, R.O., Poorthuis, B.J., 2008. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105, 2812-2817.
- Allen, M.J., Myer, B.J., Khokher, A.M., Rushton, N., Cox, T.M., 1997. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJM* 90, 19-25.
- Arias Martínez, N., Barbado Hernández, F.J., Pérez Martín, G., Pérez de Ayala, C., Casal Esteban, V., Vázquez Rodríguez, J.J., 2003. [Fabry's disease associated with rheumatoid arthritis. Multisystemic crossroads]. *An Med Interna* 20, 28-30.
- Askari, H., Kaneshi, C.R., Semino-Mora, C., Desai, P., Ang, A., Kleiner, D.E., Perlee, L.T., Quezado, M., Spollen, L.E., Wustman, B.A., Schiffmann, R., 2007. Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease. *Virchows Arch.* 451, 823-834.
- Ballabio, A., 2009. Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders. *Int J Clin Pharmacol Ther* 47 Suppl 1, S34-38.
- Balreira, A., Macedo, M.F., Girão, C., Rodrigues, L.G., Oliveira, J.P., Sá Miranda, M.C., Arosa, F.A., 2008. Anomalies in conventional T and invariant natural killer T-cell populations in Fabry mice but not in Fabry patients. *Br. J. Haematol.* 143, 601-604.
- Barak, V., Acker, M., Nisman, B., Kalickman, I., Abrahamov, A., Zimran, A., Yatziv, S., 1999. Cytokines in Gaucher's disease. *Eur. Cytokine Netw* 10, 205-210.
- Bendelac, A., Rivera, M.N., Park, S.H., Roark, J.H., 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol* 15, 535-562.
- Biancini, G.B., Vanzin, C.S., Rodrigues, D.B., Deon, M., Ribas, G.S., Barschak, A.G., Manfredini, V., Netto, C.B.O., Jardim, L.B., Giugliani, R., Vargas, C.R., 2012. Globotriaosylceramide is

- correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 226-232.
- Boyce, M., Yuan, J., 2006. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 13, 363-373.
- Brady, R.O., Gal, A.E., Bradley, R.M., Martensson, E., Warshaw, A.L., Laster, L., 1967. Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. *N. Engl. J. Med* 276, 1163-1167.
- Brennan, P.J., Tatituri, R.V.V., Brigl, M., Kim, E.Y., Tuli, A., Sanderson, J.P., Gadola, S.D., Hsu, F.-F., Besra, G.S., Brenner, M.B., 2011. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat. Immunol.* 12, 1202-1211.
- Brück, W., Goebel, H.H., Dienes, P., 1991. B and T lymphocytes are affected in lysosomal disorders--an immunoelectron microscopic study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 17, 219-222.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X., 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269-290.
- Burstein, Y., Zakuth, V., Rechavi, G., Spirer, Z., 1987. Abnormalities of cellular immunity and natural killer cells in Gaucher's disease. *J Clin Lab Immunol* 23, 149-151.
- Cabrita, M., Pereira, C.F., Rodrigues, P., Cardoso, E.M., Arosa, F.A., 2005. Altered expression of CD1d molecules and lipid accumulation in the human hepatoma cell line HepG2 after iron loading. *FEBS J.* 272, 152-165.
- Campeau, P.M., Rafei, M., Boivin, M.-N., Sun, Y., Grabowski, G.A., Galipeau, J., 2009. Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome. *Blood* 114, 3181-3190.
- Carrell, R.W., Lomas, D.A., 1997. Conformational disease. *Lancet* 350, 134-138.
- Castaneda, J.A., Lim, M.J., Cooper, J.D., Pearce, D.A., 2008. Immune system irregularities in lysosomal storage disorders. *Acta Neuropathol* 115, 159-174.
- Chévrier, M., Brakch, N., Lesueur, C., Genty, D., Ramdani, Y., Moll, S., Djavaheri-Mergny, M., Brasse-Lagnel, C., Laquerrière, A., Barbey, F., Bekri, S., 2010. Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease. *Autophagy* 6, 589 - 599.
- Clarke, J.T., 1981. The glycosphingolipids of human plasma lipoproteins. *Can. J. Biochem.* 59, 412-417.
- Clarke, J.T., Stoltz, J.M., 1976. Uptake of radiolabeled galactosyl-(alpha1 goes to 4)-galactosyl-(beta1 goes to 4)-glucosylceramide by human serum lipoproteins in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 441, 165-169.
- Clarke, J.T., Stoltz, J.M., Mulcahey, M.R., 1976. Neutral glycosphingolipids of serum lipoproteins in Fabry's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 431, 317-325.
- Costello, R., O'Callaghan, T., Sébahoun, G., 2006. Gaucher disease and multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* 47, 1365-1368.
- Cox, T.M., Cachón-González, M.B., 2012. The cellular pathology of lysosomal diseases. *J. Pathol.* 226, 241-254.
- Cybulka, M., Kleber, M., Walter, K.N., Kroeber, S.M., Neumann, H.P.H., Engelhardt, M., 2006. Is Fabry disease associated with leukaemia? *Br. J. Haematol.* 135, 264-265.
- Deganuto, M., Pittis, M.G., Pines, A., Dominissini, S., Kelley, M.R., Garcia, R., Quadrifoglio, F., Bembi, B., Tell, G., 2007. Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. *J. Cell. Physiol.* 212, 223-235.

- DeGraba, T., Azhar, S., Dignat-George, F., Brown, E., Boutière, B., Altarescu, G., McCarron, R., Schiffmann, R., 2000. Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients. *Ann. Neurol* 47, 229-233.
- Desnick, R.J., Ioannou, Y.A., Eng, C.M., 2000.  $\alpha$ -galactosidase A deficiency: Fabry disease, en: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill Professional, New York, pp. 3733-3774.
- Dinarelli, C.A., 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519-550.
- Drane, P., Bravard, A., Bouvard, V., May, E., 2001. Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression-implication in p53 mediated apoptosis. *Oncogene* 20, 430-439.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
- Facciotti, F., Ramanjaneyulu, G.S., Lepore, M., Sansano, S., Cavallari, M., Kistowska, M., Forss-Petter, S., Ni, G., Colone, A., Singhal, A., Berger, J., Xia, C., Mori, L., De Libero, G., 2012. Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus. *Nat. Immunol.* 13, 474-480.
- Farfel-Becker, T., Vitner, E., Dekel, H., Leshem, N., Enquist, I.B., Karlsson, S., Futerman, A.H., 2009a. No evidence for activation of the unfolded protein response in neuronopathic models of Gaucher disease. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1482-1488.
- Farfel-Becker, T., Vitner, E., Dekel, H., Leshem, N., Enquist, I.B., Karlsson, S., Futerman, A.H., 2009b. No evidence for activation of the unfolded protein response in neuronopathic models of Gaucher disease. *Hum. Mol. Genet* 18, 1482-1488.
- Filocamo, M., Morrone, A., 2011. Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. *Hum. Genomics* 5, 156-169.
- Formichi, P., Radi, E., Battisti, C., Pasqui, A., Pompella, G., Lazzerini, P.E., Laghi-Pasini, F., Leonini, A., Di Stefano, A., Federico, A., 2007. Psychosine-induced apoptosis and cytokine activation in immune peripheral cells of Krabbe patients. *J. Cell. Physiol.* 212, 737-743.
- Fox, H., McCarthy, P., André-Schwartz, J., Shoenfeld, Y., Miller, K.B., 1984. Gaucher's disease and chronic lymphocytic leukemia. Possible pathogenetic link between Gaucher's disease and B-cell proliferations? *Cancer* 54, 312-314.
- Fuller, M., Meikle, P.J., Hopwood, J.J., 2006. Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview, en: Mehta, A.A., Beck, M.M., Sunder-Plassmann, G.G. (Eds.), *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis, Oxford.
- Gadola, S.D., Silk, J.D., Jeans, A., Illarionov, P.A., Salio, M., Besra, G.S., Dwek, R., Butters, T.D., Platt, F.M., Cerundolo, V., 2006. Impaired selection of invariant natural killer T cells in diverse mouse models of glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *J. Exp. Med.* 203, 2293-2303.
- Galon, J., Aksentijevich, I., McDermott, M.F., O'Shea, J.J., Kastner, D.L., 2000. TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 479-486.
- Green, D.R., Kroemer, G., 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
- Hamano, K., Hayashi, M., Shioda, K., Fukatsu, R., Mizutani, S., 2008. Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. *Acta Neuropathol* 115, 547-559.
- Heare, T., Alp, N.J., Priestman, D.A., Kulkarni, A.B., Qasba, P., Butters, T.D., Dwek, R.A., Clarke, K., Channon, K.M., Platt, F.M., 2007. Severe endothelial dysfunction in the aorta of a

- mouse model of Fabry disease; partial prevention by N-butyldeoxynojirimycin treatment. *J. Inherit. Metab. Dis* 30, 79-87.
- Hollak, C.E., Evers, L., Aerts, J.M., Van Oers, M.H., 1997. Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol. Dis* 23, 201-212.
- Hong, Y.B., Kim, E.Y., Jung, S.-C., 2004. Down-regulation of Bcl-2 in the fetal brain of the Gaucher disease mouse model: a possible role in the neuronal loss. *J. Hum. Genet* 49, 349-354.
- Hong, Y.B., Kim, E.Y., Jung, S.-C., 2006. Upregulation of proinflammatory cytokines in the fetal brain of the Gaucher mouse. *J. Korean Med. Sci* 21, 733-738.
- Huang, J.Q., Trasler, J.M., Igdoura, S., Michaud, J., Hanal, N., Gravel, R.A., 1997. Apoptotic cell death in mouse models of GM2 gangliosidosis and observations on human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Hum. Mol. Genet* 6, 1879-1885.
- Ioannou, Y.A., Zeidner, K.M., Gordon, R.E., Desnick, R.J., 2001. Fabry disease: preclinical studies demonstrate the effectiveness of alpha-galactosidase A replacement in enzyme-deficient mice. *Am. J. Hum. Genet* 68, 14-25.
- Ishii, S., Chang, H.-H., Kawasaki, K., Yasuda, K., Wu, H.-L., Garman, S.C., Fan, J.-Q., 2007. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem. J* 406, 285-295.
- Jeyakumar, M., Thomas, R., Elliot-Smith, E., Smith, D.A., Van der Spoel, A.C., D' Azzo, A., Perry, V.H., Butters, T.D., Dwek, R.A., Platt, F.M., 2003. Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* 126, 974-987.
- Jou, I., Lee, J.H., Park, S.Y., Yoon, H.J., Joe, E.-H., Park, E.J., 2006. Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. *Am. J. Pathol.* 168, 1619-1630.
- Kacher, Y., Futerman, A.H., 2009. Impaired IL-10 transcription and release in animal models of Gaucher disease macrophages. *Blood Cells Mol. Dis.* 43, 134-137.
- Kalliokoski, R.J., Kalliokoski, K.K., Penttinen, M., Kantola, I., Leino, A., Viikari, J.S., Simell, O., Nuutila, P., Raitakari, O.T., 2006. Structural and functional changes in peripheral vasculature of Fabry patients. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 660-666.
- Kieseier, B.C., Goebel, H.H., 1994. Characterization of T-cell subclasses and NK-cells in lysosomal disorders by immuno-electron microscopy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20, 604-608.
- Kieseier, B.C., Wisniewski, K.E., Goebel, H.H., 1997. The monocyte-macrophage system is affected in lysosomal storage diseases: an immunoelectron microscopic study. *Acta Neuropathol.* 94, 359-362.
- Kint, J.A., 1970. The enzyme defect in Fabry's disease. *Nature* 227, 1173.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M., 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol* 60, 619-642.
- Lamanna, W.C., Lawrence, R., Sarrazin, S., Esko, J.D., 2011. Secondary storage of dermatan sulfate in Sanfilippo disease. *J. Biol. Chem.* 286, 6955-6962.
- Li, H., Repa, J.J., Valasek, M.A., Beltroy, E.P., Turley, S.D., German, D.C., Dietschy, J.M., 2005. Molecular, anatomical, and biochemical events associated with neurodegeneration in mice with Niemann-Pick type C disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 64, 323-333.
- Lieberman, A.P., Puertollano, R., Raben, N., Slaugenhaupt, S., Walkley, S.U., Ballabio, A., 2012. Autophagy in lysosomal storage disorders. *Autophagy* 8, 719-730.

- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- MacDermot, K.D., Holmes, A., Miners, A.H., 2001. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. *J. Med. Genet* 38, 750-760.
- Macedo, M.F., Quinta, R., Pereira, C.S., Sa Miranda, M.C., 2012. Enzyme replacement therapy partially prevents invariant Natural Killer T cell deficiency in the Fabry disease mouse model. *Mol. Genet. Metab.* 106, 83-91.
- Macho, A., Hirsch, T., Marzo, I., Marchetti, P., Dallaporta, B., Susin, S.A., Zamzami, N., Kroemer, G., 1997. Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J. Immunol* 158, 4612-4619.
- Mariathasan, S., Monack, D.M., 2007. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 31-40.
- Marie, J.P., Tulliez, M., Tricottet-Paczinski, V., Reynes, M., Diebold, J., 1982. Gaucher's disease with monoclonal gammopathy. Significance of splenic plasmacytosis. *Scand J Haematol* 28, 54-58.
- Marti, G.E., Ryan, E.T., Papadopoulos, N.M., Filling-Katz, M., Barton, N., Fleischer, T.A., Rick, M., Gralnick, H.R., 1988. Polyclonal B-cell lymphocytosis and hypergammaglobulinemia in patients with Gaucher disease. *Am. J. Hematol.* 29, 189-194.
- Martinez, P., Aggio, M., Rozenfeld, P., 2007. High incidence of autoantibodies in Fabry disease patients. *J. Inherit. Metab. Dis* 30, 365-369.
- Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., Tschopp, J., 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237-241.
- Masters, S.L., Simon, A., Aksentijevich, I., Kastner, D.L., 2009. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (\*). *Annu. Rev. Immunol.* 27, 621-668.
- McEachern, K.A., Fung, J., Komarnitsky, S., Siegel, C.S., Chuang, W.-L., Hutto, E., Shayman, J.A., Grabowski, G.A., Aerts, J.M.F.G., Cheng, S.H., Copeland, D.P., Marshall, J., 2007. A specific and potent inhibitor of glucosylceramide synthase for substrate inhibition therapy of Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab* 91, 259-267.
- Mehta, A., Beck, M., Elliott, P., Giugliani, R., Linhart, A., Sunder-Plassmann, G., Schiffmann, R., Barbey, F., Ries, M., Clarke, J.T.R., 2009. Enzyme replacement therapy with agalsidase alfa in patients with Fabry's disease: an analysis of registry data. *Lancet* 374, 1986-1996.
- Miao, L., St Clair, D.K., 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic. Biol. Med* 47, 344-356.
- Micheva, I., Marinakis, T., Repa, C., Kouraklis-Symeonidis, A., Vlacha, V., Anagnostopoulos, N., Zoumbos, N., Symeonidis, A., 2006. Dendritic cells in patients with type I Gaucher disease are decreased in number but functionally normal. *Blood Cells Mol. Dis.* 36, 298-307.
- Momoi, T., 2004. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J. Chem. Neuroanat* 28, 101-105.
- Moore, D.F., Goldin, E., Gelderman, M.P., Robinson, C., Baer, J., Ries, M., Elkahouloun, A., Brady, R.O., Schiffmann, R., 2008. Apoptotic abnormalities in differential gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* 97, 48-52.

- Mori, K., 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101, 451-454.
- Nagao, Y., Nakashima, H., Fukuhara, Y., Shimmoto, M., Oshima, A., Ikari, Y., Mori, Y., Sakuraba, H., Suzuki, Y., 1991. Hypertrophic cardiomyopathy in late-onset variant of Fabry disease with high residual activity of alpha-galactosidase A. *Clin. Genet.* 39, 233-237.
- Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J., 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.
- Nakao, S., Takenaka, T., Maeda, M., Kodama, C., Tanaka, A., Tahara, M., Yoshida, A., Kuriyama, M., Hayashibe, H., Sakuraba, H., 1995. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N. Engl. J. Med.* 333, 288-293.
- Namdar, M., Gebhard, C., Studiger, R., Shi, Y., Mocharla, P., Schmied, C., Brugada, P., Lüscher, T.F., Camici, G.G., 2012. Globotriaosylsphingosine accumulation and not alpha-galactosidase-A deficiency causes endothelial dysfunction in Fabry disease. *PLoS ONE* 7, e36373.
- O'Neill, L.A.J., 2008. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* 226, 10-18.
- Ohshima, T., Murray, G.J., Swaim, W.D., Longenecker, G., Quirk, J.M., Cardarelli, C.O., Sugimoto, Y., Pastan, I., Gottesman, M.M., Brady, R.O., Kulkarni, A.B., 1997. alpha-Galactosidase A deficient mice: a model of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 2540-2544.
- Oya, Y., Proia, R.L., Norflus, F., Tifft, C.J., Langaman, C., Suzuki, K., 2000. Distribution of enzyme-bearing cells in GM2 gangliosidosis mice: regionally specific pattern of cellular infiltration following bone marrow transplantation. *Acta Neuropathol* 99, 161-168.
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., Di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., Ballabio, A., 2011. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3852-3866.
- Palucka, K.A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F., Gluckman, J.C., 1998. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J. Immunol.* 160, 4587-4595.
- Park, J.L., Shu, L., Shayman, J.A., 2009. Differential involvement of COX1 and COX2 in the vasculopathy associated with the alpha-galactosidase A-knockout mouse. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296, H1133-1140.
- Park, J.L., Whitesall, S.E., D'Alecy, L.G., Shu, L., Shayman, J.A., 2008. Vascular dysfunction in the alpha-galactosidase A-knockout mouse is an endothelial cell-, plasma membrane-based defect. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35, 1156-1163.
- Pereira, C.S., Azevedo, O., Maia, M.L., Dias, A.F., Sa-Miranda, C., Macedo, M.F., 2013. Invariant Natural Killer T cells are phenotypically and functionally altered in Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*.
- Pinto, L.L.C., Vieira, T.A., Giugliani, R., Schwartz, I.V.D., 2010. Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review. *Orphanet J Rare Dis* 5, 14.
- Platt, F.M., Boland, B., Van der Spoel, A.C., 2012. The cell biology of disease: Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. *J. Cell Biol.* 199, 723-734.
- Prinetti, A., Prioni, S., Chiricozzi, E., Schuchman, E.H., Chigorno, V., Sonnino, S., 2011. Secondary alterations of sphingolipid metabolism in lysosomal storage diseases. *Neurochem. Res.* 36, 1654-1668.



- Rahman, P., Gladman, D.D., Wither, J., Silver, M.D., 1998. Coexistence of Fabry's disease and systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol* 16, 475-478.
- Ries, M., Gupta, S., Moore, D.F., Sachdev, V., Quirk, J.M., Murray, G.J., Rosing, D.R., Robinson, C., Schaefer, E., Gal, A., Dambrosia, J.M., Garman, S.C., Brady, R.O., Schiffmann, R., 2005. Pediatric Fabry disease. *Pediatrics* 115, e344-355.
- Rimkunas, V.M., Graham, M.J., Crooke, R.M., Liscum, L., 2009. TNF- $\alpha$  plays a role in hepatocyte apoptosis in Niemann-Pick type C liver disease. *J. Lipid Res.* 50, 327-333.
- Rodrigues, L.G., Ferraz, M.J., Rodrigues, D., Pais-Vieira, M., Lima, D., Brady, R.O., Sousa, M.M., Sá-Miranda, M.C., 2009. Neurophysiological, behavioral and morphological abnormalities in the Fabry knockout mice. *Neurobiol. Dis.* 33, 48-56.
- Rombach, S.M., Dekker, N., Bouwman, M.G., Linthorst, G.E., Zwinderman, A.H., Wijburg, F.A., Kuiper, S., Vd Bergh Weerman, M.A., Groener, J.E.M., Poorthuis, B.J., Hollak, C.E.M., Aerts, J.M.F.G., 2010a. Plasma globotriaosylsphingosine: Diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochim Biophys Acta* 1802, 741-748.
- Rombach, S.M., Twickler, T.B., Aerts, J.M.F.G., Linthorst, G.E., Wijburg, F.A., Hollak, C.E.M., 2010b. Vasculopathy in patients with Fabry disease: current controversies and research directions. *Mol. Genet. Metab.* 99, 99-108.
- Rozenfeld, P., Agriello, E., De Francesco, N., Martinez, P., Fossati, C., 2009. Leukocyte perturbation associated with Fabry disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*
- Rozenfeld, P.A., 2009. Fabry disease: treatment and diagnosis. *IUBMB Life* 61, 1043-1050.
- Rozenfeld, P.A., Croxatto, O., Ebner, R., Fossati, C.A., 2006. Immunofluorescence detection of globotriaosylceramide deposits in conjunctival biopsies of Fabry disease patients. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 34, 689-694.
- Rozenfeld, P.A., Fritz, M., Blanco, P., Gonzalez, P., Rinaldi, G.J., 2011. Myocardial alterations in the murine model of fabry disease can be reversed by enzyme replacement therapy. *Can J Cardiol* 27, 339-345.
- Sanchez-Niño, M.D., Sanz, A.B., Carrasco, S., Saleem, M.A., Mathieson, P.W., Valdivielso, J.M., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., Ortiz, A., 2011. Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: implications for Fabry nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 26, 1797-1802.
- Schiffmann, R., Kopp, J.B., Austin, H.A., Sabnis, S., Moore, D.F., Weibel, T., Balow, J.E., Brady, R.O., 2001. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 285, 2743-2749.
- Schümann, J., Facciotti, F., Panza, L., Michieletti, M., Compostella, F., Collmann, A., Mori, L., De Libero, G., 2007. Differential alteration of lipid antigen presentation to NKT cells due to imbalances in lipid metabolism. *Eur. J. Immunol.* 37, 1431-1441.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D.C., Ballabio, A., 2011. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332, 1429-1433.
- Settembre, C., Fraldi, A., Rubinsztein, D.C., Ballabio, A., 2008. Lysosomal storage diseases as disorders of autophagy. *Autophagy* 4, 113-114.
- Shah, J.S., Hughes, D.A., Tayebjee, M.H., MacFadyen, R.J., Mehta, A.B., Elliott, P.M., 2007. Extracellular matrix turnover and disease severity in Anderson-Fabry disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30, 88-95.
- Shen, J.-S., Meng, X.-L., Moore, D.F., Quirk, J.M., Shayman, J.A., Schiffmann, R., Kanetski, C.R., 2008. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion

- molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol. Genet. Metab* 95, 163-168.
- Shen, X., Zhang, K., Kaufman, R.J., 2004. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J. Chem. Neuroanat.* 28, 79-92.
- Shoenfeld, Y., Gallant, L.A., Shaklai, M., Livni, E., Djaldetti, M., Pinkhas, J., 1982. Gaucher's disease: a disease with chronic stimulation of the immune system. *Arch. Pathol. Lab. Med* 106, 388-391.
- Shu, L., Park, J.L., Byun, J., Pennathur, S., Kollmeyer, J., Shayman, J.A., 2009. Decreased nitric oxide bioavailability in a mouse model of Fabry disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1975-1985.
- Shu, L., Shayman, J.A., 2007. Caveolin-associated accumulation of globotriaosylceramide in the vascular endothelium of alpha-galactosidase A null mice. *J. Biol. Chem* 282, 20960-20967.
- Simonaro, C.M., D'Angelo, M., He, X., Eliyahu, E., Shtraizent, N., Haskins, M.E., Schuchman, E.H., 2008. Mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases. *Am. J. Pathol.* 172, 112-122.
- Simonaro, C.M., Ge, Y., Eliyahu, E., He, X., Jepsen, K.J., Schuchman, E.H., 2010. Involvement of the Toll-like receptor 4 pathway and use of TNF-alpha antagonists for treatment of the mucopolysaccharidoses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 222-227.
- Simonaro, C.M., Haskins, M.E., Schuchman, E.H., 2001. Articular chondrocytes from animals with a dermatan sulfate storage disease undergo a high rate of apoptosis and release nitric oxide and inflammatory cytokines: a possible mechanism underlying degenerative joint disease in the mucopolysaccharidoses. *Lab. Invest* 81, 1319-1328.
- Spada, F.M., Koezuka, Y., Porcelli, S.A., 1998. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 188, 1529-1534.
- Sugita, M., Cernadas, M., Brenner, M.B., 2004. New insights into pathways for CD1-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 90-95.
- Sun, Y., Grabowski, G.A., 2010. Impaired autophagosomes and lysosomes in neuronopathic Gaucher disease. *Autophagy* 6.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G., 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki, M., Sugimoto, Y., Ohsaki, Y., Ueno, M., Kato, S., Kitamura, Y., Hosokawa, H., Davies, J.P., Ioannou, Y.A., Vanier, M.T., Ohno, K., Ninomiya, H., 2007. Endosomal accumulation of Toll-like receptor 4 causes constitutive secretion of cytokines and activation of signal transducers and activators of transcription in Niemann-Pick disease type C (NPC) fibroblasts: a potential basis for glial cell activation in the NPC brain. *J. Neurosci.* 27, 1879-1891.
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Togawa, T., Kodama, T., Suzuki, T., Sugawara, K., Tsukimura, T., Ohashi, T., Ishige, N., Suzuki, K., Kitagawa, T., Sakuraba, H., 2010. Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. *Mol. Genet. Metab* 100, 257-261.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664-666.

- Valbuena, C., Oliveira, J.P., Carneiro, F., Relvas, S., Ganhão, M., Sá-Miranda, M.C., Rodrigues, L.G., 2011. Kidney histologic alterations in  $\alpha$ -Galactosidase-deficient mice. *Virchows Arch.* 458, 477-486.
- Van Breemen, M.J., De Fost, M., Voerman, J.S.A., Laman, J.D., Boot, R.G., Maas, M., Hollak, C.E.M., Aerts, J.M., Rezaee, F., 2007. Increased plasma macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  levels in type 1 Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 788-796.
- Vance, D.E., Krivit, W., Sweeley, C.C., 1969. Concentrations of glycosyl ceramides in plasma and red cells in Fabry's disease, a glycolipid lipidosis. *J. Lipid Res.* 10, 188-192.
- Vitner, E.B., Platt, F.M., Futerman, A.H., 2010. Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J. Biol. Chem* 285, 20423-20427.
- Walkley, S.U., 2009. Pathogenic cascades in lysosomal disease-Why so complex? *J. Inherit. Metab. Dis.* 32, 181-189.
- Walkley, S.U., Vanier, M.T., 2009. Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 726-736.
- Wei, H., Kim, S.-J., Zhang, Z., Tsai, P.-C., Wisniewski, K.E., Mukherjee, A.B., 2008. ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Hum. Mol. Genet* 17, 469-477.
- Weidemann, F., Breunig, F., Beer, M., Sandstede, J., Störk, S., Voelker, W., Ertl, G., Knoll, A., Wanner, C., Strotmann, J.M., 2005. The variation of morphological and functional cardiac manifestation in Fabry disease: potential implications for the time course of the disease. *Eur. Heart J.* 26, 1221-1227.
- Whybra, C., Kampmann, C., Willers, I., Davies, J., Winchester, B., Kriegsmann, J., Brühl, K., Gal, A., Bunge, S., Beck, M., 2001. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of disease in female heterozygotes. *J. Inherit. Metab. Dis* 24, 715-724.
- Whybra, C., Schwarting, A., Kriegsmann, J., Gal, A., Mengel, E., Kampmann, C., Baehner, F., Schaefer, E., Beck, M., 2006. IgA nephropathy in two adolescent sisters heterozygous for Fabry disease. *Pediatr. Nephrol* 21, 1251-1256.
- Wu, Y.-P., Mizukami, H., Matsuda, J., Saito, Y., Proia, R.L., Suzuki, K., 2005. Apoptosis accompanied by up-regulation of TNF- $\alpha$  death pathway genes in the brain of Niemann-Pick type C disease. *Mol. Genet. Metab* 84, 9-17.
- Yam, G.H.-F., Bosshard, N., Zuber, C., Steinmann, B., Roth, J., 2006. Pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* 290, C1076-1082.
- Zaky, A., Busso, C., Izumi, T., Chattopadhyay, R., Bassiouny, A., Mitra, S., Bhakat, K.K., 2008. Regulation of the human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 36, 1555-1566.
- Zhang, Z., Lee, Y.-C., Kim, S.-J., Choi, M.S., Tsai, P.-C., Xu, Y., Xiao, Y.-J., Zhang, P., Heffer, A., Mukherjee, A.B., 2006. Palmitoyl-protein thioesterase-1 deficiency mediates the activation of the unfolded protein response and neuronal apoptosis in INCL. *Hum. Mol. Genet* 15, 337-346.
- Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., 3rd, Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y.-P., Yamashita, T., Teneberg, S., Wang, D., Proia, R.L., Levery, S.B., Savage, P.B., Teyton, L., Bendelac, A., 2004. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306, 1786-1789.

- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., Ron, D., 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12, 982-995.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406-3415.